



Réparation de modèles de lésions photoinduites de l'ADN. Approches électrochimiques.

Fabien Boussicault

► To cite this version:

Fabien Boussicault. Réparation de modèles de lésions photoinduites de l'ADN. Approches électrochimiques.. Autre. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2006. Français. NNT: . tel-00109091

HAL Id: tel-00109091

<https://theses.hal.science/tel-00109091>

Submitted on 23 Oct 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ DE PARIS VII
ÉCOLE DOCTORALE DE CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE ANALYTIQUE
DE PARIS CENTRE (ED 388)

Afin d'obtenir

LE DIPLÔME DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

(spécialité : ÉLECTROCHIMIE)

par

Fabien Boussicault

SUJET :

**RÉPARATION DE MODELES DE LÉSIONS PHOTOINDUITES
DE L'ADN. APPROCHES ÉLECTROCHIMIQUES.**

Soutenue le 20 septembre 2006, devant la commission d'examen :

Rapporteurs	D. MARKOVITSI	DR CNRS, CEA Saclay
	P. HAPIOT	DR CNRS, Rennes
Examineurs	T. DOUKI	Chercheur, CEA Grenoble
	F. KANOUI	CR CNRS, Paris
Directeur de thèse	M. ROBERT	Professeur, Paris

à pépé Jean

à pépé Serge

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire, dirigé successivement par messieurs C. P. Andrieux et B. Limoges. Je les remercie de m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Je tiens à remercier vivement monsieur M. Robert pour avoir encadré ces travaux avec tant de compétence et d'enthousiasme. Je lui suis très reconnaissant d'avoir été disponible et de s'être impliqué comme il l'a fait pendant ces quatre années.

Madame D. Markovitsi et monsieur P. Hapiot me font l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse, je les en remercie vivement.

Messieurs T. Douki et F. Kanoufi ont bien voulu juger ce travail, qu'il me soit permis de leur adresser de très sincères remerciements.

Qu'il me soit également permis de remercier l'ensemble du laboratoire (C. Costentin, C. Demaille, K. B. Su, A. Anne, J.-M. Savéant, D. Marchal, V. Balland) et tout particulièrement M. Druet pour la résolution rapide des problèmes électroniques, P. Guiriec pour les spectres RMN et C. Guiolet pour la commande des produits et son rire inimitable. Je pense également à M.-N. Ollivier, E. Déliry, J. Coppry et D. Saunière pour leur bonne humeur et leur soutien.

Je ne puis qu'associer à ces remerciements mes collègues et amis rencontrés au cours de ces quatre années (J. Gamby, J. Abbou, D. Yazidi, F. Mavré, C. Goyer, T. Defever, A.-L. Teillout, K. Wang, S. Zhang, M. Mahet, C. Renault et C. Bonnaudat). Qu'il me soit permis de les remercier un à un pour l'excellente ambiance dans laquelle j'ai évolué tout au long de mon doctorat au LEM, ainsi que pour leur présence dans les bons comme dans les mauvais moments.

Un grand merci à mes amis (Amanda, Neary, Thirith, Valéry, Cricri, Marina, Michael, Sonia, Sylvie, Daniel, Audrey, Martine, Olivier et Gustavo) pour tous ces bons moments, passés et à venir. Et, bien sûr, Je tiens à remercier l'ensemble de ma famille (Cagnin, Martin et Boussicault), pour l'intérêt porté à mon égard, ainsi que pour la bonne humeur et la non moins bonne ambiance pendant nos repas familiaux.

Et enfin, un grand merci à papa, maman, Lydie et Bruno.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE 5

CHAPITRE 1 : Comportement des composés modèles de lésions en oxydation

<u>Introduction</u>	20
1 <u>Oxydation des cyclobutanes</u>	22
1-1 Composés modèles des lésions de l'ADN	23
1-2 Influence de la configuration <i>cis</i> ou <i>trans</i>	25
1-3 Influence de la configuration <i>syn</i> ou <i>anti</i>	26
2 <u>Oxydation des modèles d'adduits (6-4)</u>	28
2-1 Oxydation de l'oxétane 4	28
2-2 Oxydation des oxétanes 1 – 3	29
2-3 Oxydation du thiétane	30
3 <u>Description des mécanismes</u>	32
3-1 Oxydation des cyclobutanes	32
3.1.1) Mécanisme d'oxydation	32
3.1.2) Estimation des potentiels standard	34
3.1.3) Influence de la configuration du cycle	37
3.1.4) Origine de la barrière d'activation	37
3-2 Oxydation des oxétanes	40
3.2.1) Mécanisme d'oxydation de l'oxétane 4	41
3.2.2) Mécanisme d'oxydation des oxétanes 1, 2 et 3 . Mise en évidence de la régiosélectivité de l'oxydation des oxétanes modèles.	41
3.2.3) Estimation des potentiels standard	43
3.2.4) Modélisations quantiques	44
3-3 Comportement du thiétane	46
<u>Conclusion</u>	46

CHAPITRE 2 : Etude de la réaction biologiquement pertinente

<u>Introduction</u>	52
<u>1 Réduction électrochimique des cyclobutanes</u>	55
1-1 Composés de configuration <i>cis,syn</i>	55
1-2 Influence de la configuration <i>cis</i> ou <i>trans</i>	56
1-3 Influence de la configuration <i>syn</i> ou <i>anti</i>	57
1-4 Vérification expérimentale de la coupure du cycle central	57
<u>2 Réduction électrochimique des modèles d'adduits (6-4)</u>	58
2-1 Réduction des oxétanes sans acide	58
2-2 Réduction des oxétanes en présence d'acide	59
2-3 Réduction du thiétane	61
<u>3 Description des mécanismes</u>	62
3-1 Réduction des cyclobutanes	62
3.1.1) Mécanisme de réduction	62
3.1.2) Estimation des potentiels standard	64
3.1.3) Influence de la configuration du cycle	66
3.1.4) Calculs sur des molécules modèles simplifiées	67
3-2 Réduction des oxétanes	70
3.2.1) Mécanisme de réduction	70
3.2.2) Calculs quantiques	71
3-3 Réduction du thiétane	73
<u>4 Pertinence des résultats de l'électrochimie dans le cadre de la réparation enzymatique ?</u>	73
4-1 Force motrice de la réaction de transfert de charge	74
4-2 Influence de l'environnement enzymatique	74
4-3 Structure du substrat	76
4-4 Rendements quantiques de réparation enzymatique	80
<u>Conclusion</u>	82

CHAPITRE 3 : Réparation des modèles par la photolyase d'*Escherichia coli*

<u>Introduction</u>	88
<u>1 Réparation enzymatique des dimères de type cyclobutane</u>	89
1-1 Détection électrochimique du substrat	89
1-2 Suivi de la réparation enzymatique	91
1-3 Discussion	92
<u>2 Réparation enzymatique des modèles d'adduits (6-4)</u>	93
2-1 Réparation enzymatique d'un oxétane modèle	93
2-2 Réparation enzymatique du thiétane	95
2-3 Conséquences sur le mécanisme de réparation enzymatique des photoproduits pyrimidine (6-4) pyrimidone	97
<u>Conclusion</u>	98

CONCLUSION GÉNÉRALE 102

PARTIE EXPÉRIMENTALE

<u>1 Manipulations électrochimiques</u>	107
1-1 Voltamétrie cyclique linéaire	107
1-2 Électrolyse à potentiel contrôlé	109
<u>2 Produits chimiques</u>	110
2-1 Solvants et électrolyte support	110
2-2 Substrats	110
<u>3 Réparation enzymatique des modèles de lésion</u>	113
3-1 Réparation du cis,syn-DMT<>DMT	113
3-2 Réparation de l'oxétane 3 et du thiétane	114

ANNEXES

ANNEXE 1 : Oxydation des monomères N,N'-diméthyluracile (DMU) et N,N'-diméthylthymine (DMT)	116
ANNEXE 2 : Réduction des monomères N,N'-diméthyluracile (DMU) et N,N'-diméthylthymine (DMT)	118
ANNEXE 3 : Tutorial d'électrochimie	120
ANNEXE 4 : Modélisations quantiques	128

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'ADN est le support de l'information génétique dans tout être vivant. Il est également la cible de nombreux dommages occasionnés soit au cours de la réplication, soit par des éléments extérieurs ou corps étrangers. Ces altérations chimiques du code génétique (dont les caractères unitaires sont les bases adénine, guanine, thymine et cytosine, figure 1) sont variées comme le montre le nombre de réactions qui peuvent en être à l'origine : oxydation, désamination hydrolytique, formation de radicaux libres, addition électrophile, transformation photochimique ou encore réaction de substitution nucléophile. Ces modifications chimiques peuvent avoir des effets désastreux sur la viabilité de la cellule, ou à plus long terme, sur la santé de l'individu.

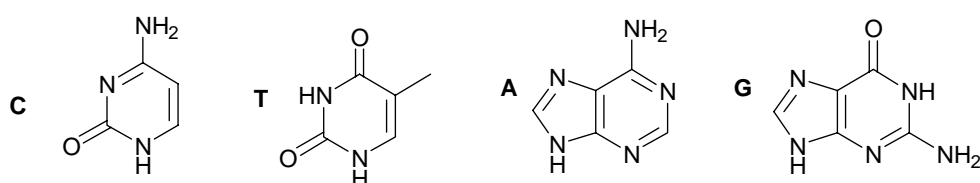


Figure 1. Bases de l'ADN.

Les transformations d'origine photochimique sont essentiellement dues au rayonnement UltraViolet de la lumière solaire qui peut induire plusieurs types de lésions sur la double hélice. Le spectre du rayonnement UV est divisé en trois domaines : UVC (200 – 280 nm), UVB (280 – 320 nm) et UVA (320 – 400 nm). Les UVC sont absorbés par la couche d'ozone, ils n'ont donc pas d'incidence biologique, ce qui n'est pas le cas des UVA et B qui ont chacun un mode d'action différent sur l'ADN. Les UVA sont les photons les moins énergétiques du spectre UV mais leur intensité est la plus importante, ils ne sont pas directement absorbés par la double hélice mais excitent des chromophores endogènes ou exogènes, qui peuvent transférer leur énergie à l'oxygène (alors excité principalement sous son état singulet), responsables de lésions dites oxydatives des bases de l'ADN (figure 2) via un processus de photosensibilisation.¹

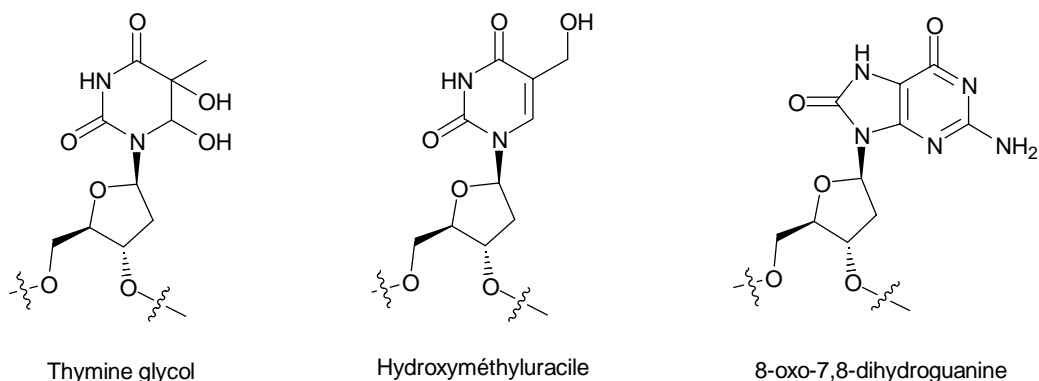


Figure 2. Exemples de lésions oxydatives sur une base thymine et une base guanine.

Les rayons UVB sont directement absorbés par l'ADN, c'est pourquoi on leur attribue la majeure partie du pouvoir cancérigène du rayonnement solaire. Leur absorption excite les bases pyrimidiniques (thymine et cytosine) à l'état triplet et induit des dimérisations aux sites comprenant deux pyrimidines adjacentes ou proches, majoritairement quand il s'agit de deux thymines. Il existe deux formes différentes de dimères : ² d'une part des cyclobutanes, de configuration *cis,syn*, *trans,syn* I ou *trans,syn* II, issus d'une photoaddition $[2\pi + 2\pi]$ entre deux doubles liaisons C–C ; d'autre part des photoproduits pyrimidine (6-4) pyrimidone et leur isomère de Dewar, résultant d'une photoaddition $[2\pi + 2\pi]$ entre une double liaison C–C et une double liaison C–O (on parle alors d'une addition de type Paterno-Büchi) suivie de l'ouverture du cycle oxétane intermédiaire (figure 3). ³ Ces derniers absorbent dans les UVA et B, ce qui conduit à leur transformation en isomère de Dewar. Les cyclobutanes sont les lésions majoritaires puisqu'ils représentent 80 % des photoproduits contre 20 % pour les adduits (6-4). ⁴ Ces altérations de l'ADN peuvent également être induites indirectement par les rayons UVA, vraisemblablement par photosensibilisation (transfert d'énergie triplet).

Quand une cellule détecte une lésion dans son ADN, elle arrête son cycle de prolifération pour que la réparation ait lieu. Mais si la fréquence des lésions est trop importante ou la réparation inefficace, un processus de mort programmée de la cellule (l'apoptose) est enclenché. Parmi les deux types de lésions photoinduites évoquées ci dessus, les adduits (6-4) sont réparés beaucoup plus vite que les cyclobutanes, dont une proportion importante est toujours présente dans l'ADN 72 heures après l'irradiation. Après une telle durée l'apoptose n'a plus lieu (elle se fait dans les 24 heures qui suivent l'endommagement) et la prolifération a repris, malgré les défauts contenus dans le code génétique. On comprend donc que les cyclobutanes ont un rôle vraisemblablement important dans la mutagénèse, en raison de leur grande persistance dans l'ADN.

Les lésions photoinduites au niveau d'un site dipyrimidinique sont réparées par deux grands types de mécanisme : la réparation par excision de nucléotide, commune à toutes les espèces vivantes, et la photoréparation, ³ mécanisme enzymatique qui n'est notamment pas à l'œuvre chez l'espèce humaine. ⁵

La réparation par excision du brin endommagé est un mécanisme de réparation général qui élimine les lésions volumineuses de l'ADN induites notamment par les rayons UV en coupant des fragments du brin qui les contient. Elle se déroule schématiquement suivant 5 étapes : reconnaissance de la lésion, délimitation d'une zone de réparation, double incision du brin endommagé de part et d'autre de la lésion par deux enzymes endonucléase, élimination après excision du brin d'ADN endommagé, et remplissage de la lacune par synthèse d'ADN.

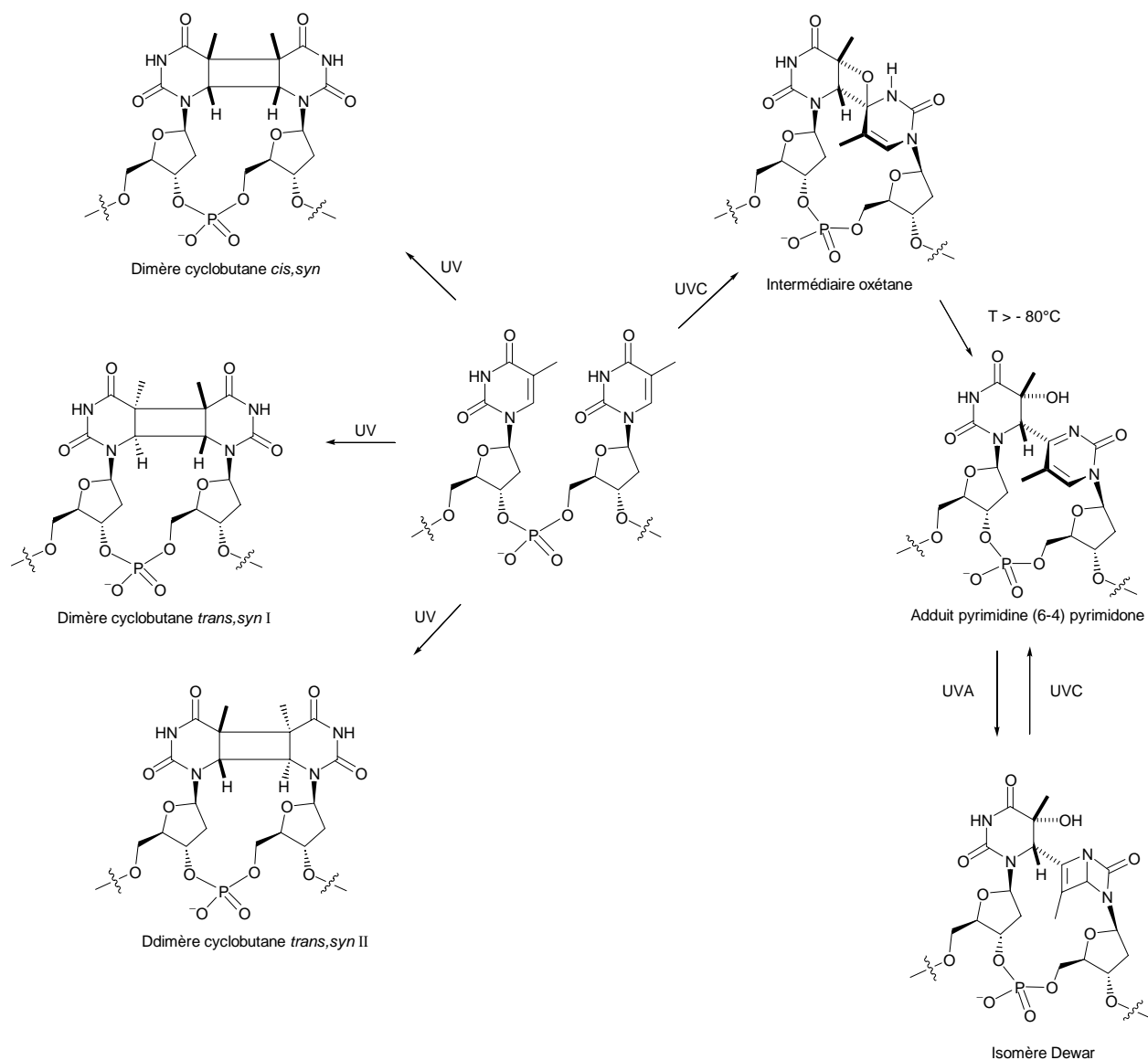


Figure 3. Principaux photoproduits obtenus au niveau des sites dipyrimidiniques de l'ADN.

Les fragments coupés ont des longueurs variables : ils comprennent 13 nucléotides chez les procaryotes et 27 nucléotides chez les eucaryotes.³ Le "trou" résultant de cette opération est refermé grâce aux enzymes ADN polymérase et ADN ligase (figure 4).

Ce mécanisme de réparation est très complexe, notamment chez l'être humain où il implique une quarantaine de gènes au total, dont une douzaine peuvent être déréglés chez les patients atteints de maladies associées à un dysfonctionnement de la réparation par excision de nucléotide.⁶ Trois maladies rares, liées à des mutations affectant des protéines de réparation par excision de nucléotide, sont connues : le syndrome de Cockayne, la trichothiodystrophie et *Xeroderma Pigmentosum*.⁶ Ces trois maladies touchent particulièrement les enfants.⁷ Le syndrome de Cockayne est une maladie héréditaire, caractérisée par plusieurs symptômes, dont un faciès peu commun (grandes oreilles et yeux rentrés dans leur orbite), un retard de croissance, une photosensibilité, ainsi qu'un

vieillessement et un décès prématurés. Les symptômes apparaissent dans la deuxième année de vie et les patients porteurs de cette pathologie décèdent en moyenne vers l'âge de 12 ans.^{7,8}

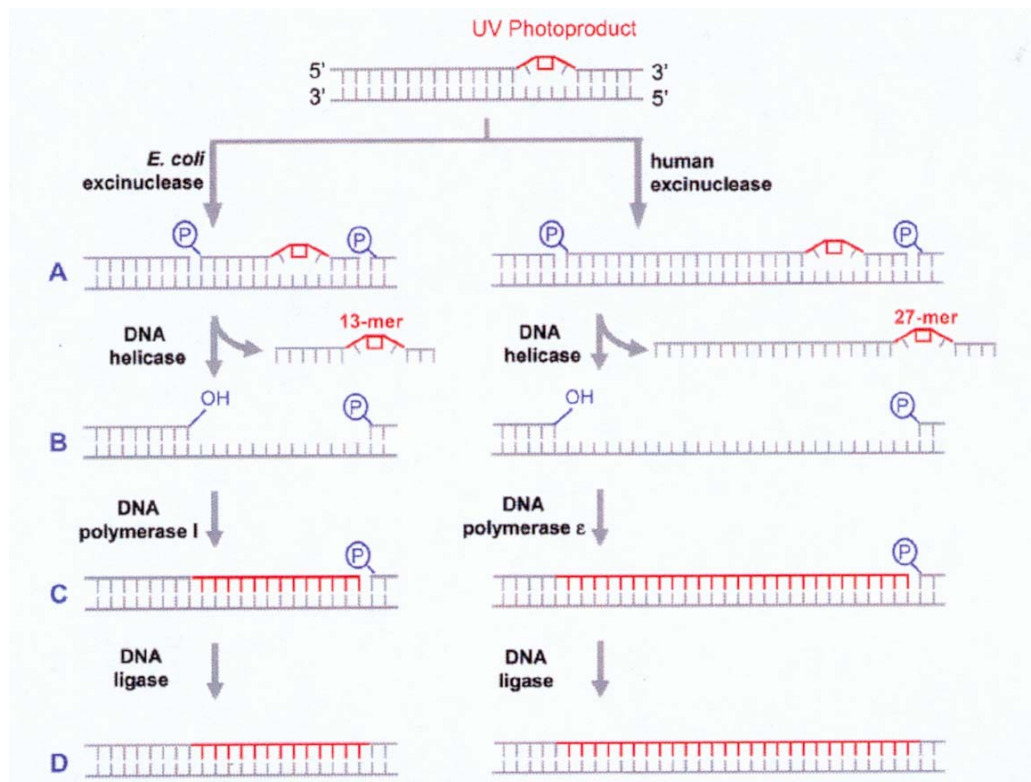


Figure 4. Réparation de photoproduit de l'ADN par excision du brin endommagé (issu de la référence 3).

La trichothiodystrophie est une maladie génétique caractérisée par une synthèse anormale de sulfures contenus dans la kératine, ce qui peut entraîner plusieurs symptômes comme des cheveux épars et fragiles, une ichtyose (maladie de la peau) congénitale, une dysplasie (malformation) des ongles et de la dentition ou un retard mental et de croissance. Chez ces patients, le brin d'ADN endommagé est bien excisé, mais la synthèse du nouveau brin est défectueuse.^{7,9} *Xeroderma Pigmentosum* est une maladie génétique qui associe une hypersensibilité sévère à la lumière solaire (UV), une petite taille, des anomalies de pigmentation cutanée et des troubles neurologiques.⁷ Elle favorise le développement des cancers cutanés et oculaires avec une incidence multipliée par 2000 par rapport au reste de la population, contraignant ainsi les malades à éviter toute exposition à la lumière du jour. La maladie présente huit sous-types liés à des mutations des gènes codant pour les enzymes mises en jeu lors de la réparation de l'ADN. Plusieurs associations ont été créées dans le monde pour aider les personnes atteintes de cette maladie.¹⁰ C'est l'archétype d'une famille de maladies liées à une défaillance de la réparation par excision de base de l'ADN.

Plus généralement, les lésions photoinduites de l'ADN peuvent être à l'origine de plusieurs maladies de la peau, dont le mélanome cutané, forme agressive de cancer de la peau. C'est la forme de cancer la plus répandue aux Etats-Unis. En France le mélanome cutané est la tumeur dont l'incidence a le plus augmenté chez l'homme entre 1978 et 2000 (+ 5,9 % par an).¹¹ Chez la femme ce taux d'accroissement (+ 4,3 % par an) n'est précédé que par celui des cancers de la thyroïde (+ 4,8 %). Parallèlement à l'incidence, la mortalité due à ce type de cancer a elle aussi augmenté sur la même période (environ 2,5 % par an), causant plus de 1300 décès en France en l'an 2000. Il est d'ailleurs surprenant de noter que si les femmes sont le plus touchées par le mélanome cutané, le nombre de décès liés à ce cancer est supérieur chez l'homme : durant cette même année 2000, plus de 7000 nouveaux cas de mélanomes ont été enregistrés en France, dont 42 % chez l'homme et 58 % chez la femme, alors que 52 % des décès concernent les hommes (704 contre 660 chez les femmes). Deux hypothèses ont été émises pour expliquer cette surmortalité masculine : la première est que le diagnostic est fait à un stade plus tardif chez l'homme, la seconde est qu'à stade égal les cas masculins auraient une évolutivité plus rapide et plus sévère que les cas féminins. On note également que l'incidence d'un cancer de la peau varie suivant la période de naissance : un homme né en 1953 a 10 fois plus de risques d'être atteint d'un mélanome cutané qu'un homme né en 1913.¹¹ Cette tendance risque de perdurer, notamment en raison de la disparition de la couche d'ozone, qui est notre première protection contre les radiations solaires qui dégradent l'ADN. Des calculs ont montré qu'à chaque diminution de 1 % de la couche d'ozone, la vitesse de développement des cancers augmente de 4 %.¹²

Si le mécanisme de réparation des lésions photoinduites par excision de nucléotide est commun à toutes les espèces vivantes, il existe chez certaines espèces une deuxième voie de réparation impliquant des enzymes redox nommées photolyases. Ces enzymes sont classées en deux groupes, en fonction de leur substrat naturel (lésions de type cyclobutane, ou photoproduits (6-4)). Ce mécanisme enzymatique de réparation de l'ADN s'appelle la photoréactivation.^{3,13} Les Photolyases ADN, capables de réparer les lésions de type cyclobutane, sont des protéines monomériques de 450-550 acides aminés, de masse molaire de l'ordre de 60 kDa. Elles possèdent deux cofacteurs chromophores : le premier, commun à toutes les photolyases, est la flavine adénine dinucléotide (FAD) active sous sa forme doublement réduite et protonnée FADH^- , le second est soit une folate (méthényltétrahydrofolate, MTHF), soit une déazaflavine (8-hydroxy-5-déazariboflavine, 8-HDF). Ces cofacteurs sont représentés sur la figure 5.³

Chaque cofacteur joue un rôle qui lui est propre. La FADH^- sert de catalyseur et est directement impliquée dans le clivage du dimère, alors que le MTHF et le 8-HDF servent de photoantenne, grâce à leur fort coefficient d'extinction molaire dans la région du proche UV (300–500 nm). Ils absorbent plus de 90 % des photons qui vont servir à la photoréactivation du brin endommagé.

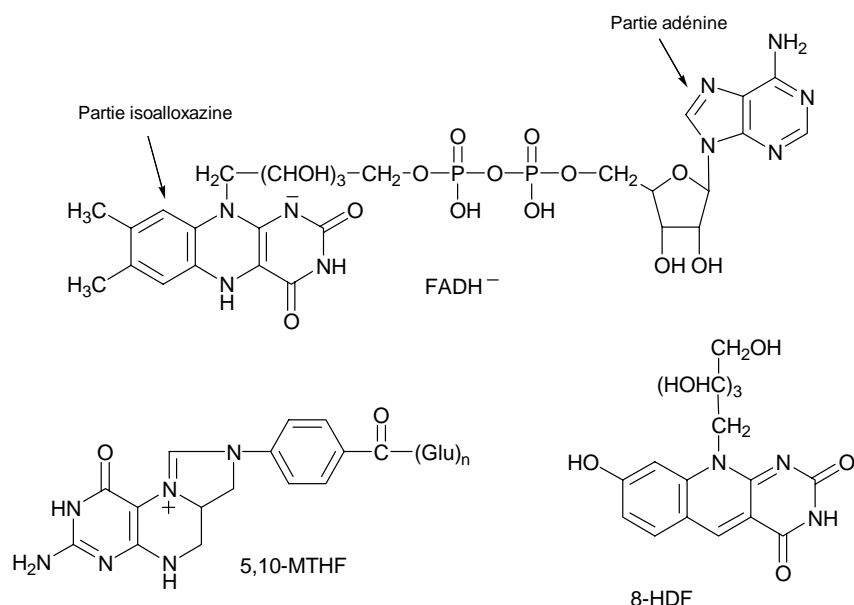


Figure 5. Cofacteurs des enzymes de type photolyase.

Les structures cristallines de trois photolyases ADN ont été déterminées : il s'agit des photolyases de *Escherichia coli* (*E. coli*),¹⁴ de *Anacystis nidulans*¹⁵ et de *Thermus thermophilus*¹⁶. Bien que ces trois enzymes ne possèdent pas forcément la même photoantenne, leurs structures sont remarquablement similaires. La photolyase la plus connue est celle d'*E. coli* (figure 6).³

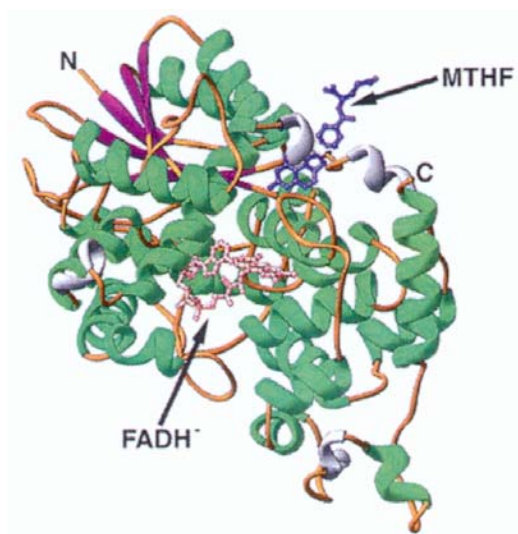


Figure 6. Structure de la photolyase de *E. Coli* (issue de la référence 3).

Elle appartient à la classe des folates, elle est composée de deux domaines bien définis : un domaine α/β N-terminal et un domaine d'hélices α C-terminal, connectés l'un à l'autre par une longue boucle interdomaine qui s'enroule autour du domaine α/β . La photoantenne MTHF se situe dans une "crevasse" peu profonde entre les deux domaines, une partie du cofacteur dépassant au-delà de la surface de l'enzyme. Le cofacteur FAD est enfoui à l'intérieur du domaine α -hélical et adopte une conformation inhabituelle en forme de U avec les anneaux isoalloxasine et adénine placés en vis-à-vis. La flavine est en fait accessible via une cavité située au milieu du domaine, dont les dimensions et la polarité sont bien adaptées pour l'arrimage d'un dimère constitué de deux bases thymine. L'enzyme reconnaît la lésion suivant un mécanisme appelé "dinucleotide flipping" : ¹⁷ sa surface est parcourue en longueur par un sillon chargé positivement qui interagit avec le squelette phosphaté du brin d'ADN qui est localement déformé. La lésion est alors positionnée à l'intérieur de la cavité du site actif contenant le cofacteur catalytique FADH^- .

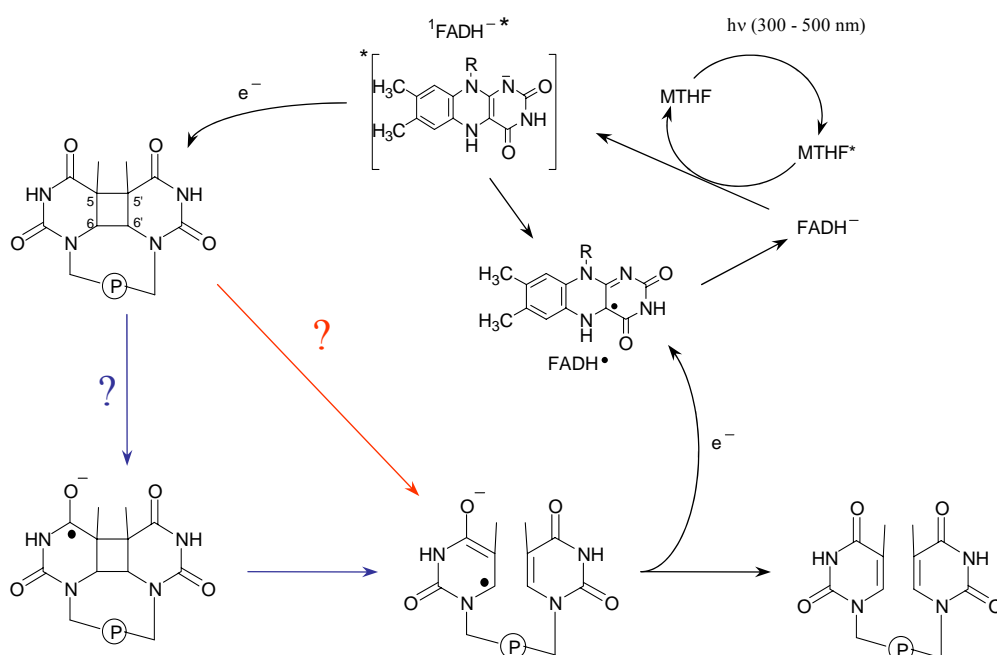


Figure 7. Mécanisme probable de réparation des lésions de type cyclobutane par photoréactivation.

L'ensemble des études biochimiques faites à ce jour indique que la photoréactivation se déroule suivant un mécanisme catalytique de transfert d'électron (figure 7). Après s'être liée au brin d'ADN endommagé au niveau de la lésion, l'enzyme absorbe un photon (300 – 500 nm) grâce à son premier cofacteur (MTHF ou 8-HDF) qui transfère ensuite son énergie au second (FADH^-) par un mécanisme de type Förster (interaction dipôle-dipôle), la distance séparant le centre des deux cofacteurs étant de l'ordre de 17 Å. La flavine, dans un état excité singulet $^1(\text{FADH}^-)^*$, transfère un électron au dimère dipyrimidinique.³ Les liaisons 5–5' et 6–

6' de l'anneau cyclobutane se coupent successivement pour former deux monomères, un sous forme neutre, l'autre sous forme d'un radical anion. Le cycle catalytique est bouclé par oxydation du radical anion du monomère pyrimidinique qui cède son électron excédentaire à la flavine neutre FADH^\bullet , régénérant ainsi la forme active FADH^- (figure 7).

Les (6-4) photolyases reconnaissent les produits d'addition (6-4). Elles ont une structure similaire à celle des photolyases ADN, et possèdent en effet les deux mêmes cofacteurs. L'activation du cycle enzymatique a lieu par absorption d'un photon UV.^{18,19} Le mécanisme par lequel elles réparent les lésions reste à ce jour assez spéculatif. Le transfert d'énergie interchromophore semble être identique, même s'il n'y a pas de preuve expérimentale, et le mécanisme de réparation démarrerait par un transfert d'électron, comme lors de la réparation des cyclobutanes.²⁰ Il a été proposé qu'en s'accrochant au brin d'ADN endommagé, la (6-4) photolyase convertit la forme ouverte du photoproduit en un intermédiaire de type oxétane²¹ (hétérocycle contenant un atome d'oxygène) ou azétidine (hétérocycle contenant un atome d'azote), par une réaction catalysée par la présence de deux résidus histidine présents au niveau du site actif (figure 8).²² Le transfert d'électron initié par FADH^\bullet se produirait alors vers l'intermédiaire, déclenchant la coupure de la liaison C–O puis celle d'une liaison C–C, le site dipyrimidinique retrouvant finalement sa structure originale.

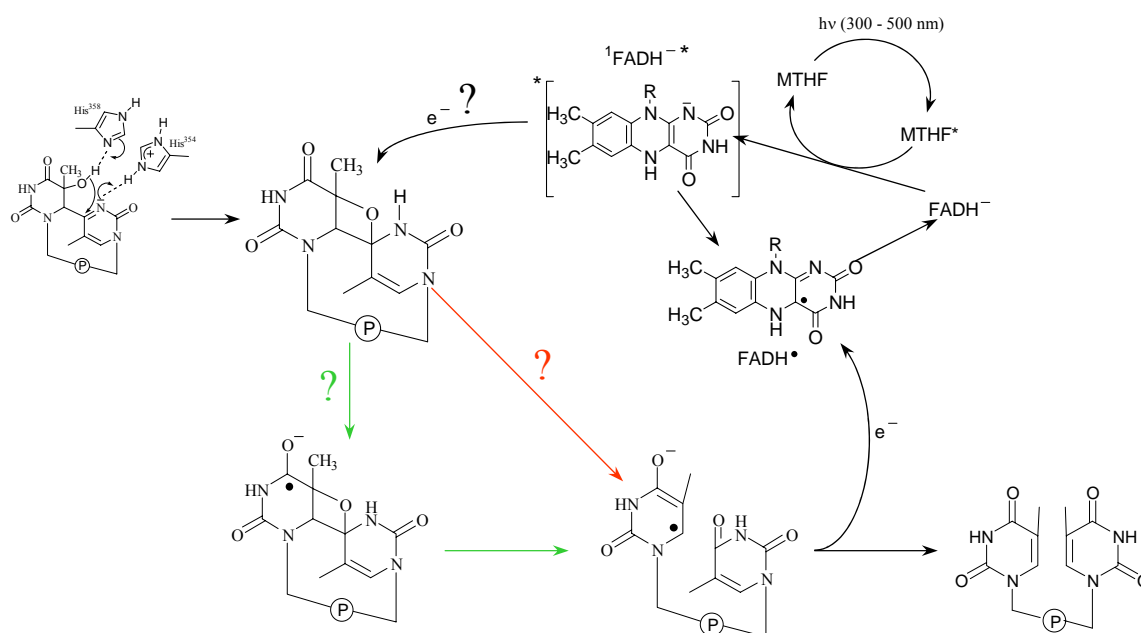


Figure 8. Mécanisme possible de réparation des photoproduits (6-4) par photoréactivation.

Une différence marquante entre les deux réparations réside dans l'efficacité de l'enzyme : les photolyases ADN réparent les lésions dipyrimidiniques avec un rendement

quantique compris entre 0,7 et 0,98 tandis que les (6-4) photolyases ont un rendement quantique de réparation beaucoup plus faible, 0,05 - 0,1.³

Si les mécanismes de réparation enzymatique des cyclobutanes et des adduits (6-4) semblent connus ou suggérés dans leur schéma d'ensemble, des questions importantes restent encore posées quant au mécanisme catalytique de transfert d'électron aboutissant à la reformation des bases initiales. En particulier, la réduction à un électron des lésions de type cyclobutane conduit-elle à un intermédiaire réactionnel de type radical anion ou est-elle concertée avec la coupure de la première liaison C–C (figure 9) ? Qu'en est-il de la seconde coupure homolytique qui aboutit à la restauration de la séquence initiale ? La stéréochimie de l'anneau à quatre atomes a-t-elle un effet sur le transfert d'électron vers ou à partir des lésions ? Comment démontrer (ou infirmer) que la réparation des adduits (6-4) suit un mécanisme par transfert d'électron ? Dans le cas affirmatif, les différences de rendement quantique de réparation des photolyases ADN et des (6-4) photolyases sont-elles dues au caractère séquentiel ou concerté de la réaction de transfert d'électron couplé à la rupture de liaison envers chacun des deux substrats ? Ces interrogations excèdent le simple cadre du mécanisme enzymatique évoqué ici, et sont de portée tout à fait générale. Mon travail de thèse s'est inscrit dans ce cadre et cette problématique d'une meilleure compréhension au niveau intime du mécanisme d'action des photolyases durant le cycle catalytique. L'approche que nous avons suivie est basée sur l'utilisation conjointe de méthodes électrochimiques, de calculs par modélisation quantique et de modèles structure / réactivité du transfert d'électron dissociatif. Dans ce cadre nos études expérimentales ont été réalisées sur différentes petites molécules, modèles de lésions photoinduites de l'ADN.

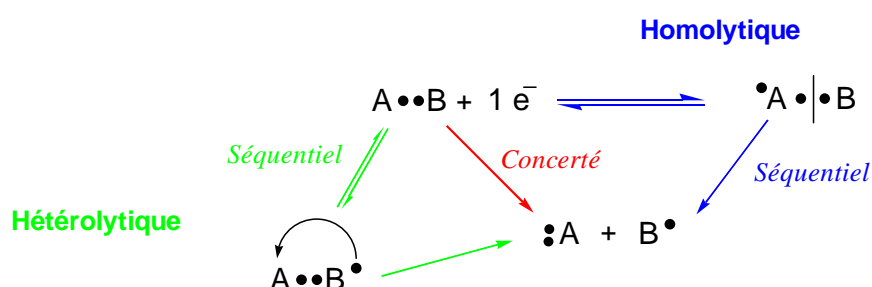
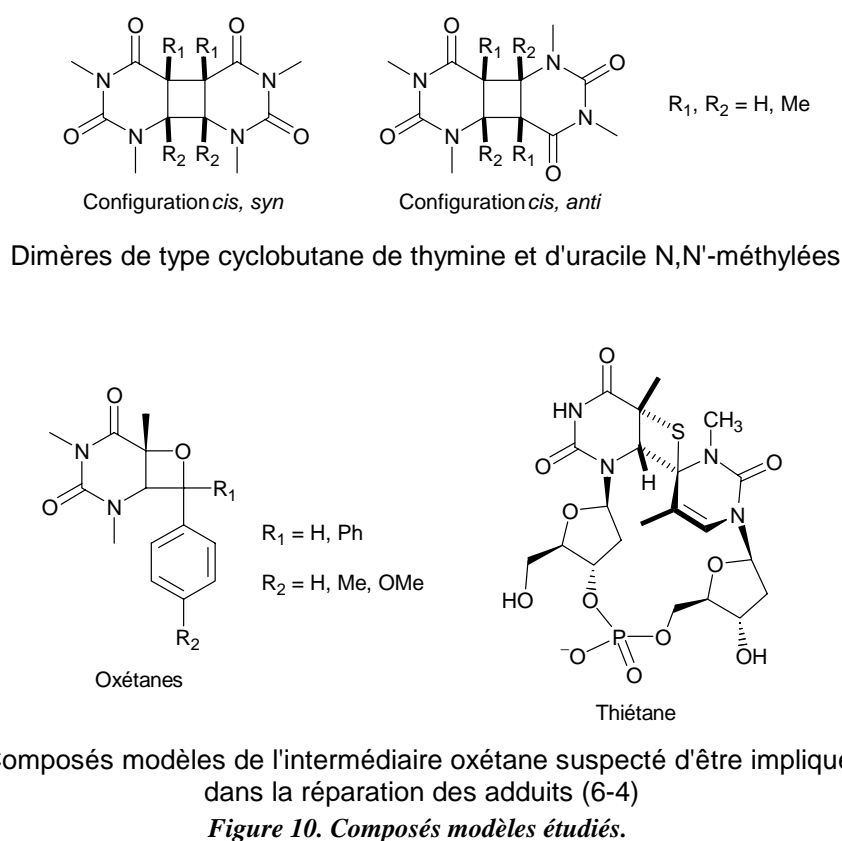


Figure 9. Transfert d'électron couplé à une rupture de liaison. Chemins de réaction.

Les différentes molécules que nous avons étudiées sont présentées sur la figure 10. Il s'agit de modèles représentant les deux types de lésions photoinduites de l'ADN impliquant deux bases thymine. Les dimères de type cyclobutane ont été obtenus par photocycloaddition de deux monobases thymine ou uracile (méthylées sur les atomes d'azote). Les synthèses ont

été réalisées par l'équipe du professeur Uta Wille (Kiel, Allemagne et Melbourne, Australie). Suivant la même méthodologie (cycloaddition photodéclenchée entre une base thymine et différents composés carbonylés aromatiques), nous avons ensuite synthétisé des oxétanes modèles. L'oxétane issu de deux monobases thymine n'a pu être étudié car il est instable à des températures supérieures à -80°C , c'est pourquoi nous avons opté pour des modèles, même si on s'éloigne ainsi de la lésion biologique. Un moyen pour synthétiser un modèle plus proche en terme de structure de l'oxétane formé dans l'ADN est de remplacer l'atome d'oxygène de l'hétérocycle résultant de la cycloaddition entre nucléotides par un atome de soufre. Le thiétane ainsi obtenu est stable à température ambiante. En collaboration avec Pascale Clivio et son équipe (ICSN, Gif-sur-Yvette) qui en a réalisé la synthèse, nous avons étudié le composé représenté sur la figure 10. Il se démarque des autres lésions car les deux bases sont aussi reliées entre elles via leur sucre phosphate.



Dans notre démarche de compréhension des mécanismes à l'œuvre dans les photolyases, nous avons entrepris des études systématiques par voltamétrie cyclique des différents modèles en milieu organique aprotique sur des électrodes de carbone vitreux de dimension millimétrique, en réduction comme en oxydation. Les mécanismes d'oxydation des lésions ont a priori peu de pertinence dans le cadre de la réparation enzymatique de l'ADN,

mais ils ont un intérêt plus fondamental, liés à la réactivité sous transfert électronique des petits cycles. Dans une première partie nous nous focaliserons donc sur l'oxydation des composés modèles. Nous essaierons en particulier de déterminer si l'oxydation déclenchée par voie électrochimique aboutit à la rupture du cycle à 4 atomes et quels sont les mécanismes suivis, en fonction de la nature du cycle, de sa configuration et de la nature des substituants présents. Dans un second chapitre, nous nous intéresserons à l'étude de la réaction qui mime la réparation des modèles de lésions, c'est-à-dire la réduction. Les mécanismes suivis seront détaillés et nous discuterons de l'utilisation de ces résultats dans le cadre de la compréhension de la réparation des lésions dans un brin d'ADN. Enfin, dans une dernière partie, et en nous appuyant sur l'ensemble des résultats électrochimiques, nous montrerons qu'il est possible d'étudier l'activité de la photolyase ADN d'*E. coli* à l'aide de méthodes électrochimiques, en prenant pour substrat les modèles précédemment étudiés. Nous en tirerons de nouvelles informations sur les mécanismes enzymatiques, en particulier pour ce qui concerne la réparation des lésions (6-4).

BIBLIOGRAPHIE

-
- ¹ Lukin, M. et de los Santos, C. (2006) NMR structures of damaged DNA, *Chem. Rev.*, **106**, 607-686.
- ² Douki, T., Reynaud-Angelin, A., Cadet, J. et Sage, E. (2003) Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation, *Biochemistry*, **42**, 9221-9226.
- ³ Sancar, A. (2003) Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors, *Chem. Rev.*, **103**, 2203-2237.
- ⁴ Perdiz, D., Gróf, P., Mezzina, M., Nikaido, O., Moustacchi, E. et Sage, E. (2000) Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells, *J. Biol. Chem.*, **275**, 26732-26742.
- ⁵ Li, Y. F., Kim, S. T. et Sancar, A. (1993) Evidence for lack of DNA photoreactivating enzyme in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4389-4393.
- ⁶ Cleaver, J. E. (2005) Cancer in Xeroderma Pigmentosum and related disorders of DNA repair, *Nature Reviews Cancer*, **5**, 564-573.
- ⁷ de Boer, J. et Hoeijmakers, J. H. J. (2000) Nucleotide excision repair and human syndromes, *Carcinogenesis*, **21**, 453-460.
- ⁸ Nance, M. A. et Berry, S. A. (1992) Cockayne syndrome : review of 140 cases, *Am. J. Med. Genet.*, **42**, 68-84.
- ⁹ Price, V. H., Odom, R. B., Ward, W. H. et Jones, F. T. (1980) Trichothiodystrophy: sulfur-deficient brittle hair as a marker for a neuroectodermal symptom complex, *Arch. Dermatol.*, **116**, 1375-1384.
- ¹⁰ Xeroderma pigmentosum society : <http://www.xps.org/>, Les enfants de la lune : <http://www.orpha.net/nestasso/AXP/debut.htm>.
- ¹¹ Chérié-Challine, L., Halna, J.-M. et Remontent, L. (2004) Situation épidémiologique du mélanome cutané en France et impact en termes de prévention, *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, **2**, 5-8.
- ¹² Taylor, J. S. (1994) Unravelling the molecular pathway from sunlight to skin cancer, *Acc. Chem. Res.*, **27**, 76-82.
- ¹³ (a) Ce phénomène a été découvert en 1949. ^{13b} (b) Cleaver, J. E. (2003) Photoreactivation, *DNA repair* 2, 629-638.
- ¹⁴ Park, H. W., Kim, S. T., Sancar, A. et Deisenhofer, J. (1995) Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*, *Science*, **268**, 1866-1872.

-
- ¹⁵ Tamada, T., Kitadokoro, K., Higuchi, Y., Inaka, K., Yasui, A., de Ruiter, P. E., Eker, A. P. M. et Miki, K. (1997) Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*, *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 887-891.
- ¹⁶ Komori, H., Masui, R., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Shibata, T., Inoue, Y. et Miki, K. (2001) Crystal structure of thermostable DNA photolyase : pyrimidine-dimer recognition mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 13560-13565.
- ¹⁷ Vande Berg, B. J. et Sancar, G. B. (1998) Evidence for dinucleotide flipping by DNA photolyase, *J. Biol. Chem.*, **273**, 20276-20284.
- ¹⁸ (a) Todo, T., Takemori, H., Ryo, H., Ihara, M., Matsunaga, T., Nikaido, O., Sato, K. et Nomura, T. (1993) A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts, *Nature*, **361**, 371-374. (b) Cichon, M. K., Arnold, S. et Carell, T. (2002) A (6-4) photolyase model: repair of DNA (6-4) lesions requires a reduced and deprotonated flavin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 767-769.
- ¹⁹ Hitomi, K., Kim, S. T., Iwai, S., Harima, N., Otsoshi, E., Ikenaga, M. et Todo, T. (1997) Binding and catalytic properties of *Xenopus* (6-4) photolyase, *J. Biol. Chem.*, **272**, 32591-32598.
- ²⁰ Zhao, X., Liu, J., Hsu, D. S., Zhao, S., Taylor, J. S. et Sancar, A. (1997) Reaction mechanism of (6-4) photolyase, *J. Biol. Chem.*, **272**, 32580-32590.
- ²¹ Kim, S. T., Malhotra, K., Smith, C. A., Taylor, J. S. et Sancar, A. (1994) Characterization of (6-4) photoproduct DNA photolyase, *J. Biol. Chem.*, **269**, 8535-8540.
- ²² Hitomi, K., Nakamura, H., Kim, S. T., Mizukoshi, T., Ishikawa, T., Iwai, S. et Todo, T. (2001) Role of two Histidines in the (6-4) photolyase reaction, *J. Biol. Chem.*, **276**, 10103-10109.

CHAPITRE 1

Comportement des composés modèles de
lésions en oxydation

Introduction

Même si la réparation enzymatique de l'ADN par les photolyases implique la réduction des lésions photoinduites, l'oxydation de molécules modèles a donné lieu à de nombreuses études antérieures. La raison en est que le sens du transfert d'électron qui est au cœur de ce mécanisme n'était toujours pas connu au début des années 1990.¹ Avant cette date, la rupture des cyclobutanes a été étudiée aussi bien en oxydation qu'en réduction. D'un point de vue expérimental, des études ont été menées sur l'oxydation de dimères de cyclobutane par un accepteur d'électron en solution excité par voie photochimique, les accepteurs les plus efficaces étant les quinones (en particulier l'anthraquinone sulfonate, AQS) ou le chloranile (CHL).² Les premières expériences, à la fin des années 60, ont permis la mise en évidence de la rupture des cyclobutanes suite à leur irradiation en présence de CHL ou d'AQS (schéma 1).³

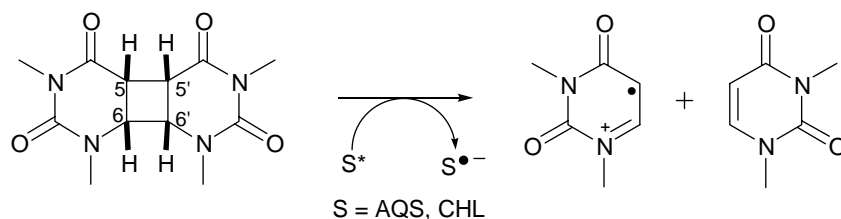


Schéma 1. Oxydation photoinduite d'un composé modèle de cyclobutane par un donneur homogène.

Les auteurs de cette étude (Rosenthal et Elad) n'évoquent pas de transfert d'électron et envisagent un transfert d'énergie, aussi bien pour la rupture des composés modèles que pour la réparation enzymatique des lésions photoinduites (les premiers à proposer un transfert électronique comme origine de la réparation seront Roth et Lamola en 1972).⁴ Les résultats montrent aussi une influence de la configuration du cycle central sur le rendement de réparation. De même, les résultats obtenus dans les années 70 et 80 montrent un effet de la configuration du cycle sur la vitesse de réparation des modèles de lésion, avec une coupure plus rapide des dimères de thymine de configuration *trans,syn* que ceux de configuration *cis,syn*.^{5,6} Les mécanismes ont été explorés plus avant par la suite, notamment à l'aide de la technique photo-CIDNP (polarisation nucléaire dynamique induite photochimiquement), qui a abouti à l'identification du radical cation de dimères de DMT et DMU de différentes configurations, créé par perte d'un électron.⁷ Ces études ont mis en évidence l'influence de la configuration du cycle central, le rendement de réparation des modèles étant moindre pour les dimères de N,N'-diméthyluracile de configuration *anti*. La durée de vie du radical cation des

dimères de cyclobutanes a été estimée à $10^{-10} - 10^{-9}$ s en milieu aqueux et à température ambiante.

Récemment, l'oxydation de dimères d'uraciles méthylées par le radical nitrate NO_3^\bullet , généré par voie photochimique, a également permis de mettre en évidence la coupure du cycle.⁸ Les auteurs ont constaté une influence de la configuration du cycle sur l'efficacité de la réparation, mais leurs observations sont en contradiction avec celles précédemment citées puisque dans cette étude les dimères de configuration *syn* sont réparés plus facilement que les *anti*. Cette étude montre que le radical nitrate, jusque là connu pour induire des dommages oxydatifs sur les nucléosides, peut avoir un impact positif sur l'ADN en réparant des lésions de type cyclobutane.

En ce qui concerne la réparation enzymatique des adduits (6-4), un mécanisme possible implique le re-formation de l'oxétane intermédiaire mis en jeu dans l'endommagement de l'ADN (voir introduction générale). Cet intermédiaire serait impliqué dans l'étape clé de transfert d'électron. Pour étayer ce mécanisme, une stratégie possible est d'étudier des modèles de type oxétane. Les études de coupure oxydative d'oxétanes sont plus rares que celles impliquant des cyclobutanes. Une étude a été menée avec des oxétanes modèles, synthétisés par addition $[2\pi + 2\pi]$ d'une thymine méthylée avec la benzophénone ou le benzaldéhyde (schéma 2).⁹ Les résultats indiquent une coupure du motif oxétane suite à son oxydation par un accepteur d'électron photoexcité. La coupure du cycle mène à la re-formation des composés précurseurs, même si le rendement quantique de formation de la diméthylthymine mesuré est faible en raison de la grande réactivité du radical cation de celle-ci. La réparation a été suivie par déclin de la fluorescence du sensibilisateur, ici le 9,10-dicyanoanthracène (DCA) ou le tétraacétylriboflavine ((AcO)₄Fl), en fonction de l'augmentation de la concentration du substrat.

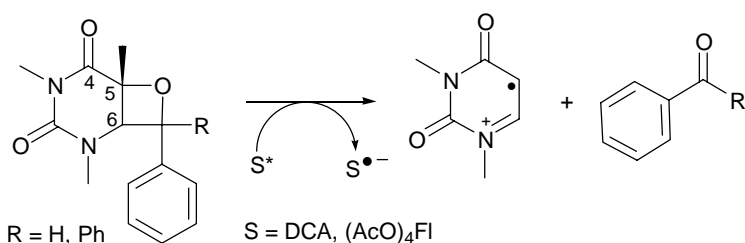


Schéma 2. Oxydation photoinduite d'un oxétane modèle par un donneur homogène.

Si la rupture de modèles de lésions photoinduites de l'ADN (dimères de type cyclobutane d'uraciles et de thymines N-méthylées, et oxétanes synthétisés par cycloaddition d'une diméthylthymine et de carbonyles aromatiques) suite à l'oxydation à un électron a bien

été montrée, nous n'avons pas d'informations sur les mécanismes suivis, notamment à une électrode. Est-ce que l'oxydation électrochimique de cyclobutanes et d'oxétanes modèles aboutit effectivement à la rupture du cycle à quatre atomes ? Si tel est le cas, le transfert d'électron et la rupture de liaison consécutive se font-ils en deux étapes distinctes ou sont-ils concertés ? La stéréochimie autour du cycle dans les cyclobutanes a-t-elle une influence sur le transfert d'électron oxydatif ? Nous nous sommes donc intéressés à l'étude par voltamétrie cyclique de l'oxydation de ces composés modèles à une électrode de carbone vitreux millimétrique. Toutes les études en oxydation ont été réalisées en milieu organique (dans l'acétonitrile, ACN, ou le diméthylformamide, DMF) avec comme électrolyte support le tétrafluoroborate de tétrabutylammonium (TBAF) à une concentration de 0,1 M.

1 Oxydation des cyclobutanes

Les composés étudiés sont des dimères de bases thymine ou uracile méthylées au niveau des azotes (diméthyluracile, DMU et diméthylthymine, DMT), synthétisés par l'équipe du professeur Wille (Kiel, Allemagne et Melbourne, Australie). Ils ont été obtenus par irradiation avec une lampe à xénon sous atmosphère inerte de la monobase méthylée, (cycloaddition $[2\pi + 2\pi]$). Les différentes molécules étudiées correspondent à différentes configurations autour du cycle central (*cis* ou *trans*, *syn* ou *anti*), et sont représentées sur le schéma 3.

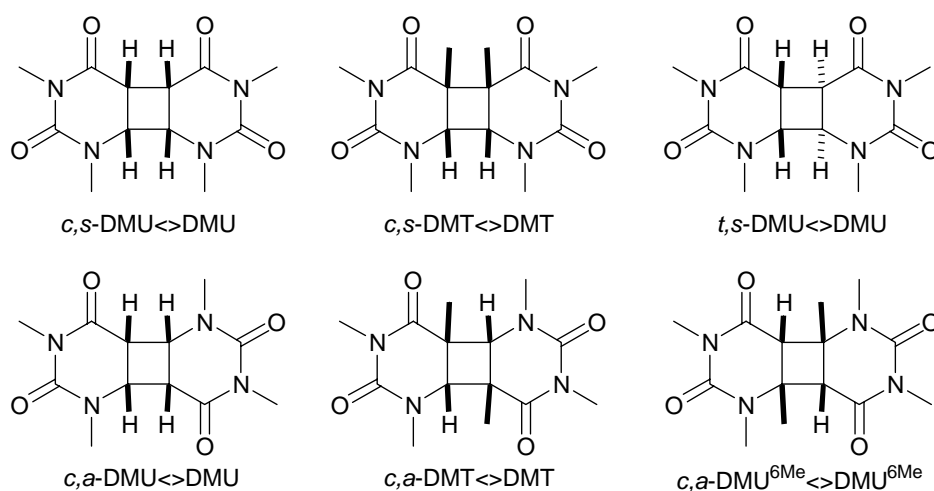


Schéma 3. Cyclobutanes modèles étudiés.

1-1 Composés modèles des lésions de l'ADN

Nous avons commencé par étudier deux types de dimères de pyrimidine représentatifs de la lésion photoinduite majoritaire : le *cis,syn*-DMU \leftrightarrow DMU et le *cis,syn*-DMT \leftrightarrow DMT. Ces deux composés présentent un comportement très similaire par oxydation à une électrode. Les voltamogrammes du *c,s*-DMU \leftrightarrow DMU présentent deux vagues bien séparées (figure 11).

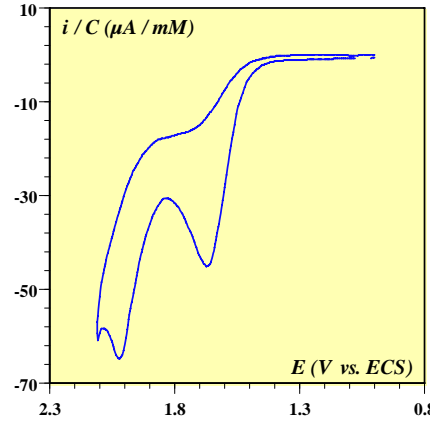


Figure 11. Oxydation du *cis,syn*-DMU \leftrightarrow DMU sur une électrode de carbone vitreux dans ACN.
 $C = 3,46 \text{ mM}$, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

La première vague se situe à + 1,68 V vs. ECS à $0,1 \text{ V s}^{-1}$, sa largeur à mi-hauteur est de 90 mV et le potentiel de pic se déplace linéairement avec la vitesse de balayage avec une pente de + 52 mV par décade de $\log \nu$ et ne varie pas avec la concentration du dimère. La stœchiométrie électronique de cette première vague est déterminée par comparaison à la vague d'oxydation monoélectronique et réversible de la benzoquinone dans le même solvant. Le courant de pic de cette vague est donné par :¹⁰

$$i_{p_{\text{benzo}}} = 0,446 F C^0 D^{1/2} S \left(\frac{F\nu}{RT} \right)^{1/2} \quad (1)$$

Lorsque l'oxydation du substrat est gouvernée par un transfert électronique irréversible, le courant de pic vaut :

$$i_p = 0,496 n \alpha^{1/2} F C^0 D^{1/2} S \left(\frac{F\nu}{RT} \right)^{1/2}$$

i_p : intensité du courant de pic

n : nombre d'électron échangé

α : coefficient de transfert

ν : vitesse de balayage

D : coefficient de diffusion

C^0 : concentration du substrat

S : surface de l'électrode

Pour $\alpha = 0,5$:

$$i_p = 0,351 n F C^0 D^{1/2} S \left(\frac{F\nu}{RT} \right)^{1/2}$$

Nous verrons plus tard que la cinétique de l'oxydation des composés étudiés est conjointement contrôlée par le transfert de charge et une réaction chimique consécutive, le courant s'écrit alors :

$$i_p = \Psi_p n F C^0 D^{1/2} S \left(\frac{Fv}{RT} \right)^{1/2} \quad (2)$$

Ψ_p est un courant de pic adimensionnel, compris entre 0,351 et 0,527,¹⁰ et il est déterminé à partir de la largeur à mi-hauteur des vagues. On peut alors calculer le nombre d'électrons échangés :

$$n = \left(\frac{0,446}{\Psi_p} \right) \left(\frac{i_p}{i_{p_{benzo}}} \right) \left(\frac{C_{benzo}^0}{C^0} \right) \left(\frac{D_{benzo}}{D} \right)^{1/2} \quad (3)$$

Il s'agit de tenir compte, comme le montre l'équation (3), de la différence entre les coefficients de diffusion des dimères et de la benzoquinone. Ces coefficients peuvent être estimés par application de l'équation de Stokes-Einstein : $D = k_B T / 6\pi\eta a$, dans laquelle η est la viscosité du solvant et a le rayon de sphère dure équivalente de la molécule considérée. Un calcul par modélisation quantique montre que les composés modèles étudiés ont à peu près le même rayon. On calcule la racine carrée du rapport des coefficients de diffusion et l'équation (3) devient :

$$n = 1,11 \left(\frac{0,446}{\Psi_p} \right) \left(\frac{i_p}{i_{p_{benzo}}} \right) \left(\frac{C_{benzo}^0}{C^0} \right) \quad (4)$$

L'application de l'équation (4) montre que la première oxydation du *c,s*-DMU \rightleftharpoons DMU se fait selon un mécanisme au cours duquel 2 électrons sont échangés ($n_{calculé} = 2,2$).

La deuxième vague d'oxydation se situe à un potentiel très positif, + 2,02 V vs ECS à 0,1 V s⁻¹. Par comparaison avec la première vague, on peut estimer qu'elle est également biélectronique. La stœchiométrie électronique et le potentiel de pic de cette deuxième vague montrent qu'elle correspond à l'oxydation du monomère DMU dans les mêmes conditions (+ 2,01 V vs. ECS à 0,1 V s⁻¹), comme nous l'avons montré par ailleurs (voir annexe 1), ce qui prouve qu'il y a coupure du cycle sur la première vague (schéma 4).

Des résultats analogues sont obtenus en oxydant le *c,s*-DMT \rightleftharpoons DMT. Les voltamogrammes présentent deux vagues rapprochées, comme le montre la figure 12. La première vague apparaît à un potentiel de + 1,67 V vs. ECS à 0,1 V s⁻¹, sa largeur est de 80 mV et son potentiel de pic se déplace linéairement avec la vitesse de balayage (+ 52 mV par décade, comme le *c,s*-DMU \rightleftharpoons DMU) et ne varie pas avec la concentration du dimère.

L'analyse de la hauteur de la vague indique qu'un mécanisme à 2 électrons par molécule de substrat est suivi ($n_{\text{calculé}} = 1,9$).

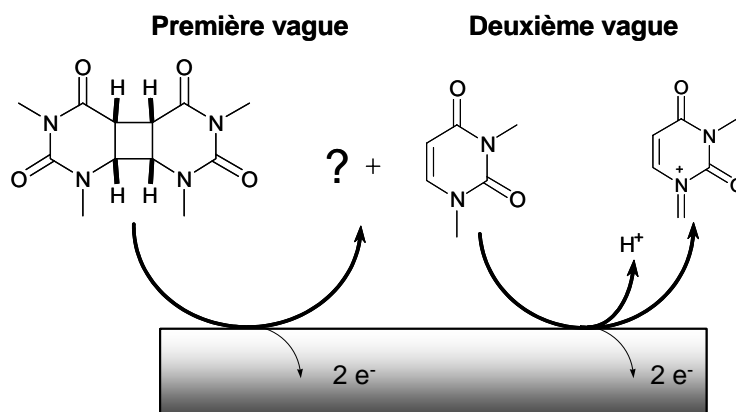


Schéma 4. Oxydation du *c,s*-DMU<->DMU à une électrode.

La deuxième vague, située à un potentiel de + 1,80 V vs. ECS à 0,1 V s⁻¹, correspond à l'oxydation du monomère DMT comme nous l'avons démontré par ailleurs (voir annexe 1). La présence de cette deuxième vague est la preuve que l'oxydation du dimère déclenche la coupure du cycle central. On observe également qu'en augmentant la vitesse de balayage à quelques volts par seconde les deux vagues se confondent, cela s'explique par le fait que la deuxième vague se "déplace moins vite" que la première quand on augmente la vitesse de balayage.

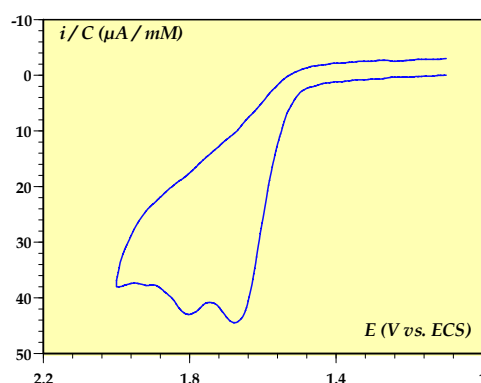


Figure 12. Oxydation du *cis,syn*-DMT<->DMT sur une électrode de carbone vitreux dans ACN. $C = 2,00 \text{ mM}$, $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

1-2 Influence de la configuration *cis* ou *trans*

La configuration *cis* ou *trans* est liée la position relative des deux pyrimidines par rapport au plan du cycle central. Une configuration *cis* signifie que les deux bases sont du même côté du cycle (on peut dire que la molécule est en configuration bateau) alors que la configuration *trans* indique que les deux bases ne sont pas du même côté du cycle

(configuration chaise, schéma 5). Pour évaluer l'influence de cette isomérisie nous avons étudié le *trans,syn*-DMU \rightleftharpoons DMU dans les mêmes conditions que le dimère *cis,syn*. Le voltamogramme obtenu est similaire à celui enregistré avec les composés *cis,syn*.

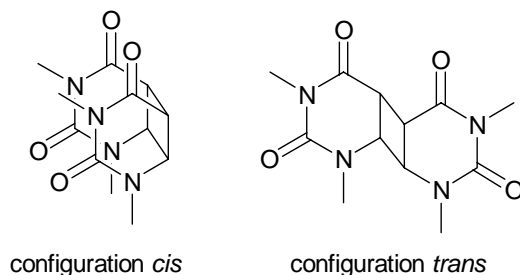


Schéma 5. Configurations *cis* et *trans* de dimères du *N,N'*-diméthyluracile.

On observe deux vagues anodiques. La première présente un pic à + 1,70 V vs. ECS à 0,1 V s⁻¹, avec une largeur à mi-hauteur de 85 mV à la même vitesse, elle se déplace linéairement avec la vitesse de balayage (+ 60 mV par décade) et ne varie pas avec la concentration du substrat. La stœchiométrie électronique a été mesurée à 2 électrons par molécule oxydée ($n_{\text{calculé}} = 2,10$). Ces valeurs sont proches de celles obtenues avec le dimère de configuration *cis,syn*. La deuxième vague se situe à un potentiel beaucoup plus positif que la première, + 2,02 V vs. ECS à 0,1 V s⁻¹, soit au même potentiel que la deuxième vague anodique observée avec le *c,s*-DMU \rightleftharpoons DMU, ce qui montre que la première oxydation aboutit à la coupure du cycle à quatre atomes.

La similarité des voltamogrammes obtenus avec les dimères de configuration *cis* ou *trans* montre que cette isomérisie n'a qu'un effet marginal sur l'oxydation des cyclobutanes.

1-3 Influence de la configuration *syn* ou *anti*

Cette isomérisie est liée à l'orientation relative des deux cycles pyrimidiniques. Une configuration *syn* indique que les deux bases sont dans le même sens (les deux fonctions cétones du C(4) se font face) tandis que la configuration *anti* indique que les deux bases sont têtes bêtes (le carbone en position 4 de l'une est en face de l'azote en position 1 de l'autre, schéma 6). Nous avons étudié en détail l'oxydation du *cis,anti*-DMU^{6Me} \rightleftharpoons DMU^{6Me}, du *cis,anti*-DMU \rightleftharpoons DMU et du *cis,anti*-DMT \rightleftharpoons DMT.

Les voltamogrammes obtenus lors de l'oxydation du *c,a*-DMU^{6Me} \rightleftharpoons DMU^{6Me} (voir schéma 3) ne présentent qu'une seule vague anodique, très positive (+ 2,02 V vs. ECS à 0,1 V s⁻¹, figure 13), large de 69 mV et dont le potentiel varie avec la vitesse de balayage de + 45 mV par décade mais pas avec la concentration du dimère.

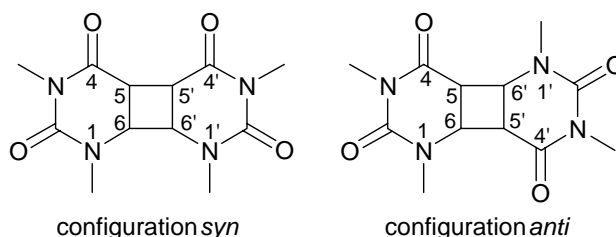


Schéma 6. Configurations syn et anti des dimères de N,N' -diméthyluracile.

L'analyse de la vague montre que l'oxydation consomme 4 électrons par molécule de substrat ($n_{\text{calculé}} = 3,73$).

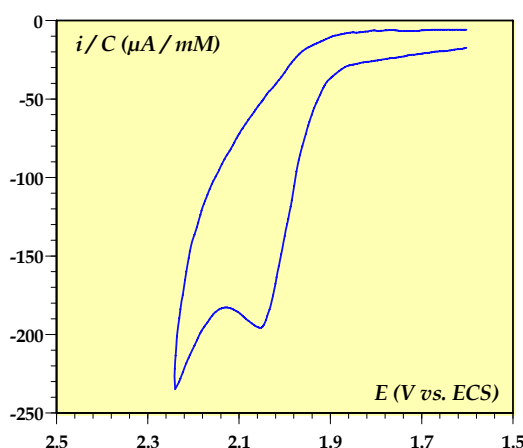


Figure 13. Oxydation du $\text{cis,anti-DMU}^{6\text{Me}} \rightleftharpoons \text{DMU}^{6\text{Me}}$ sur une électrode de carbone vitreux dans ACN. $C = 1,50 \text{ mM}$, $\nu = 0,5 \text{ V s}^{-1}$.

Les voltamogrammes du $c,a\text{-DMU} \rightleftharpoons \text{DMU}$ présentent également une seule vague anodique, très positive ($E_p = +2,05 \text{ V vs. ECS}$ à $0,1 \text{ V s}^{-1}$), large de 60 mV et dont le potentiel de pic se déplace linéairement avec la vitesse de balayage (+ 42 mV par décade). L'oxydation de ce dimère implique aussi 4 électrons ($n_{\text{calculé}} = 3,50$). De même, le $c,a\text{-DMT} \rightleftharpoons \text{DMT}$ s'oxyde suivant une seule vague, à un potentiel de + 1,99 V vs. ECS à $0,1 \text{ V s}^{-1}$, large de 75 mV et dont le potentiel de pic se déplace de + 54 mV par décade avec la vitesse de balayage. La stœchiométrie électronique est de 4 électrons par molécule de substrat ($n_{\text{calculé}} = 4,50$).

Les cyclobutanes de configuration *anti* sont oxydés suivant le même mécanisme que ceux de configuration *syn*, l'oxydation biélectronique du dimère aboutit à la rupture du cycle central et à la formation de la monobase méthylée, qui s'oxyde à son tour suivant un mécanisme impliquant la perte de deux électrons. Mais la première oxydation est plus difficile à faire, elle a lieu à un potentiel auquel la monobase créée est déjà oxydable, c'est pourquoi on observe une unique vague à 4 électrons.

2 Oxydation des modèles d'adduits (6-4)

De la même manière que les cyclobutanes, les oxétanes étudiés ont été synthétisés par photocycloaddition entre une thymine méthylée (DMT) et un carbonyle aromatique, suivant un mécanisme dit de Paterno-Büchi. La DMT est irradiée avec une lampe à xénon (150 W) sous atmosphère inerte, en présence du carbonyle aromatique de sorte qu'une cycloaddition $[2\pi + 2\pi]$ se produise entre la double liaison C–C de la thymine et la double liaison C=O du carbonyle aromatique. Pour synthétiser les oxétanes **1**, **2**, **3** et **4**, les carbonyles précurseurs utilisés sont respectivement la benzophénone, le benzaldéhyde, le p-tolualdéhyde et le p-anisaldéhyde (schéma 7).¹¹

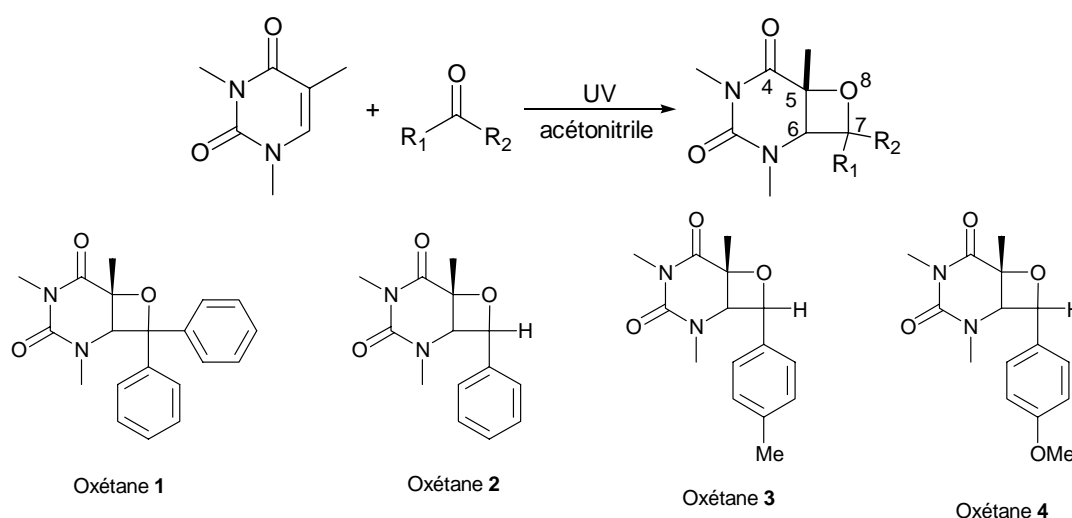


Schéma 7. Oxétanes étudiés.

2-1 Oxydation de l'oxétane 4

Les voltamogrammes obtenus montrent deux vagues anodiques (figure 14). La première se situe à un potentiel de + 1,45 V vs. ECS à 0,1 V s⁻¹, sa largeur à mi-hauteur est de 43 mV, son potentiel de pic varie linéairement avec la vitesse de balayage avec une pente de 44 mV par décade. La stœchiométrie électronique a été calculée de la même manière que pour les dimères de type cyclobutane, c'est-à-dire par comparaison avec la vague d'oxydation monoélectronique de la benzoquinone dans le même solvant, pour lequel le courant de pic est exprimé par l'équation (1). Le courant de pic de la vague d'oxydation de l'oxétane **4** est donné par l'équation (2), dans laquelle le courant de pic adimensionnel Ψ_p est compris entre 0,351 et 0,527 (nous verrons plus tard que la cinétique de la réaction d'oxydation des oxétanes est contrôlée à la fois par le transfert électronique et par une réaction chimique consécutive).

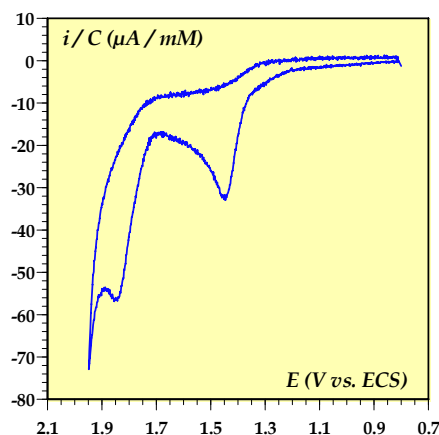


Figure 14. Oxydation de l'oxétane **4** sur une électrode de carbone vitreux dans ACN.
 $C = 1,36 \text{ mM}$, $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

De même qu'avec les cyclobutanes on évalue le rapport entre les coefficients de diffusion du substrat et le standard, et on en déduit le nombre d'électrons échangés :

$$n = 1,13 \left(\frac{0,446}{\Psi_p} \right) \left(\frac{i_p}{i_{p_{benzo}}} \right) \left(\frac{C_{benzo}^0}{C^0} \right) \quad (5)$$

La stœchiométrie électronique de la vague anodique de l'oxétane **4** est légèrement supérieure à 1 ($n_{calculé} = 1,35$).

La deuxième vague se situe à + 1,85 V vs. ECS à $0,1 \text{ V s}^{-1}$, et ses caractéristiques (potentiel, hauteur) montrent qu'elle correspond à la vague anodique de la DMT. L'oxydation de **4** aboutit donc à la rupture du cycle oxétane avec formation de la base pyrimidine neutre ainsi que du radical cation du p-méthoxybenzaldéhyde. C'est donc le motif p-méthoxybenzyle et non le motif pyrimidine qui est oxydé, hypothèse renforcée par le fait que le potentiel d'oxydation de l'alcool p-méthoxybenzylique (+ 1,60 V vs. ECS à $0,1 \text{ V s}^{-1}$) est moins positif que celui de la DMT (+ 1,81 V) à la même vitesse.

2-2 Oxydation des oxétanes **1** à **3**

Les voltamogrammes des oxétanes **1** à **3** présentent une seule vague d'oxydation irréversible (figure 15). En passant de l'oxétane **1** à **2** puis **3**, le potentiel de pic devient de moins en moins positif, variant de + 1,77 à + 1,60 V vs. ECS à $0,1 \text{ V s}^{-1}$, et la largeur à mi-hauteur diminue, de 75 à 55 mV. Le potentiel de pic se déplace linéairement avec la vitesse de balayage avec une pente de l'ordre de + 45 mV par décade pour chacun des trois composés. La stœchiométrie électronique des vagues est calculée par comparaison avec la vague monoélectronique réversible de la benzoquinone à partir de l'équation (5) pour les oxétanes **2**

et **3**. Pour l'oxétane **1**, le facteur correctif lié au coefficient de diffusion est un peu plus élevé (la molécule est plus grosse que **2 – 4**) :

$$n = 1,18 \left(\frac{0,446}{\Psi_p} \right) \left(\frac{i_p}{i_{p_{benzo}}} \right) \left(\frac{C_{benzo}^0}{C^0} \right) \quad (6)$$

Les vagues anodiques des oxétanes **1**, **2** et **3** sont biélectroniques (leur stœchiométrie est calculée respectivement à 1,95, 2,20 et 1,85 électrons par molécule).

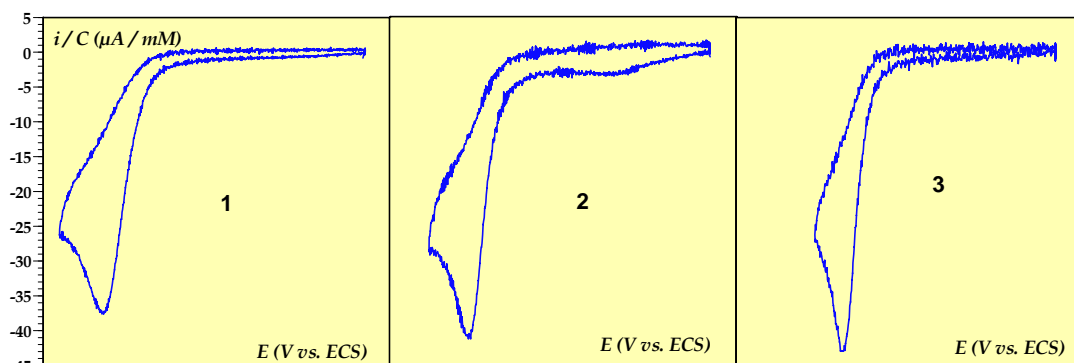


Figure 15. Oxydation des oxétanes **1**, **2** et **3** sur une électrode de carbone vitreux dans ACN.
1: oxétane **1** (2,39 mM); **2**: oxétane **2** (1,08 mM); **3**: oxétane **3** (1,42 mM); $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Les résultats obtenus avec ces trois oxétanes sont très similaires à ceux observés avec les cyclobutanes, il est très probable que l'oxydation de ces composés aboutisse à la rupture du cycle à quatre atomes. Le fait que ces vagues soient biélectroniques montre que la coupure a lieu avec formation de la DMT sous sa forme radicalaire cationique, oxydable au potentiel auquel elle est formée. L'absence de vague d'oxydation de la thymine neutre confirme cette remarque, ainsi que la régiosélectivité de l'oxydation, qui dépend donc des substituants portés par le carbone C(7) (schéma 7).

2-3 Oxydation du thiétane

La structure du thiétane que nous avons étudié est très proche de celle de l'oxétane suspecté d'être un intermédiaire clé dans la réparation des adduits (6-4) *in vivo*. Il est formé par cycloaddition d'un dinucléotide de thymine et de thiothymine (schéma 8). Cette synthèse a été réalisée par Pascale Clivio à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, Gif-sur-Yvette). La présence de la chaîne phosphatée rend le substrat peu soluble en milieu organique, nous l'avons donc dissous dans de l'eau avant de le diluer dans le diméthylformamide.

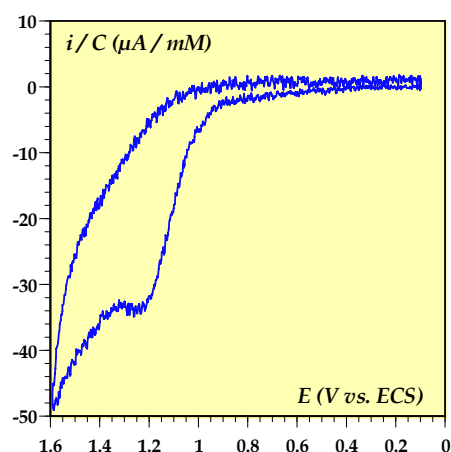


Figure 16. Oxydation du thiétane sur une électrode de carbone vitreux dans DMF. $C = 1,67 \text{ mM}$, $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

L'oxydation du thiétane dans ces conditions fait apparaître une seule vague située à + 1,24 V vs. ECS à $0,1 \text{ V s}^{-1}$, large (120 mV à la même vitesse) et se déplaçant linéairement avec la vitesse de balayage avec une pente de + 72 mV par décade. Pour calculer la stœchiométrie électronique de la vague, nous avons utilisé la même méthode que précédemment. La présence des cycles pentose de la chaîne phosphatée induit un facteur correctif lié au coefficient de diffusion plus élevé que celui de l'oxétane **1** :

$$n = 1,28 \left(\frac{0,446}{\Psi_p} \right) \left(\frac{i_p}{i_{p_{benzo}}} \right) \left(\frac{C_{benzo}^0}{C^0} \right) \quad (7)$$

L'application de l'équation (7) montre que 4 électrons sont échangés lors de cette oxydation ($n_{calculé} = 3,85$). L'absence de vague à + 1,8 V et la stœchiométrie électronique de la vague observée suggèrent que l'oxydation du thiétane ne mène pas à la coupure du cycle à quatre atomes. C'est l'atome de soufre qui est oxydé en sulfone, impliquant un mécanisme à 4 électrons et deux molécules d'eau dont le bilan est résumé sur le schéma 8.¹²

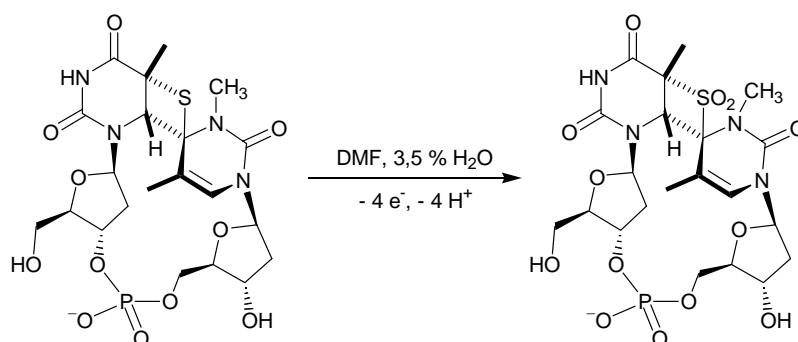


Schéma 8. Mécanisme probable d'oxydation du thiétane à une électrode de carbone vitreux.

3 Description des mécanismes

3-1 Oxydation des cyclobutanes

3.1.1) Mécanisme d'oxydation

Les résultats obtenus sur l'oxydation des différents composés modèles sont rassemblés dans le tableau 1.

Tableau 1. Données voltamétriques pour l'oxydation des cyclobutanes (295 K).

composé	E_p^a	ΔE^b	$\partial E_p / \partial \log v^c$	n^d
<i>c,s</i> -DMU \rightleftharpoons DMU	1,68	80	52	2,25 ^e
<i>c,s</i> -DMT \rightleftharpoons DMT	1,67	80	52	1,95 ^e
<i>t,s</i> -DMU \rightleftharpoons DMU	1,70	80	60	2,10 ^e
<i>c,a</i> -DMU \rightleftharpoons DMU	2,05	60	42	3,50
<i>c,a</i> -DMT \rightleftharpoons DMT	1,99	75	54	4,50
<i>c,a</i> -DMU ^{6Me} \rightleftharpoons DMU ^{6Me}	2,02	65	45	3,75

a: en V vs. ECS, à 0,1 V s⁻¹. b: largeur de vague à mi-hauteur ($E_p - E_{p/2}$) à 0,1 V s⁻¹. c: en mV / décade. d: stœchiométrie électronique. e: première vague d'oxydation

Le mécanisme d'oxydation est très similaire pour les différents substrats. Prenons l'exemple du *c,s*-DMU \rightleftharpoons DMU. Le déplacement du potentiel de pic ainsi que la largeur de la première vague anodique mènent à une valeur du coefficient de transfert α proche de 0,5 (ce qui signifie que le potentiel de réduction est voisin du potentiel standard de l'espèce réduite) une valeur caractéristique d'un mécanisme séquentiel. Si le mécanisme était concerté, la barrière d'activation serait plus importante en raison de l'énergie à fournir pour rompre la liaison (on peut montrer dans ce cas que la barrière intrinsèque ΔG_0^\ddagger vaut $(D + \lambda_0)/4$ où D et λ_0 sont respectivement l'énergie de dissociation homolytique et l'énergie de réorganisation du solvant, voir annexe 3). La réaction serait alors ralentie, ce qui se traduirait expérimentalement par des vagues beaucoup plus larges que celles que nous obtenons (typiquement $|E_p - E_{p/2}|$ de l'ordre de 120 – 140 mV à faible vitesse de balayage), c'est-à-dire des coefficients de transfert très inférieurs à 0,5 (0,3 – 0,4), ce qui n'est pas le cas ici. Le mécanisme d'oxydation du dimère est donc séquentiel, il se compose d'une première étape de transfert d'électron suivie, dans un second temps, d'une réaction chimique irréversible de premier ordre. La coupure du cycle est mise en évidence par la présence de la vague

d'oxydation de la diméthyluracile. Au total, l'oxydation du dimère implique la perte de deux électrons par molécule. Le mécanisme du schéma 9 résume le processus suivi.

La perte d'un premier électron mène à la formation du radical cation du dimère. Il se produit alors un transfert d'électron intramoléculaire depuis le doublet n de l'azote sur lequel le radical cation est principalement développé vers l'orbitale σ^* de la liaison C(6)–C(6') qui subit une coupure homolytique. Une barrière d'activation caractérise cette étape (voir calculs quantiques). Cette première coupure est immédiatement suivie de la coupure homolytique de la liaison C(5)–C(5'). Ces deux coupures successives forment deux bases DMU, une neutre et l'autre sous forme de radical cation $\text{DMU}^{\bullet+}$. Ce dernier perd immédiatement un proton et un deuxième électron pour former un cation imminium DMU^+ , qui va être lentement hydrolysé en uracile monométhylé MU. ⁸ Le monomère neutre DMU résultant de la coupure du dimère est oxydé le long de la seconde vague anodique, suivant un mécanisme à deux électrons et un proton. ⁸

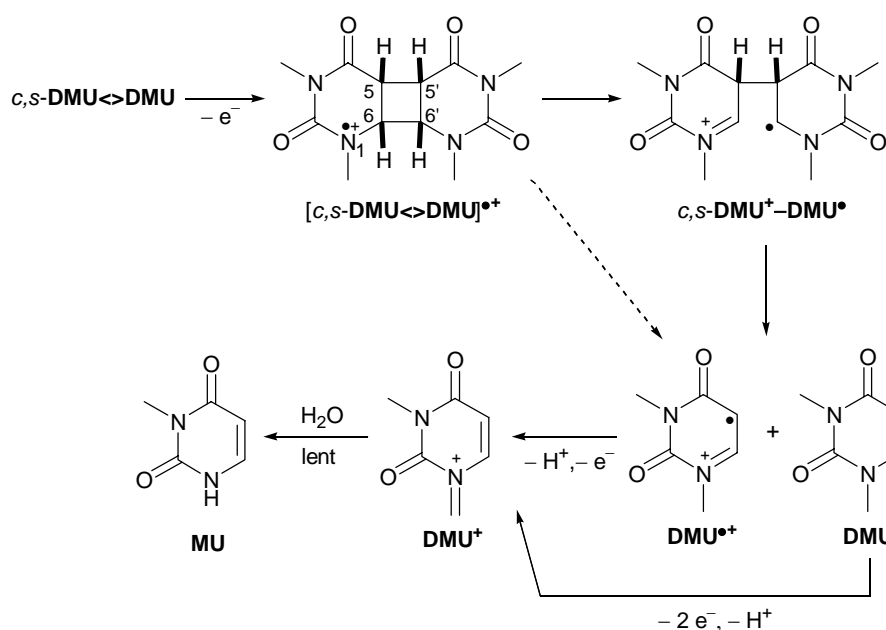


Schéma 9. Mécanisme d'oxydation des dimères de type cyclobutane. Cas de *c,s*-DMU<->DMU.

Les résultats de la voltamétrie cyclique pour le *c,s*-DMT<->DMT et le *t,s*-DMU<->DMU sont quasiment identiques à ceux du *c,s*-DMU<->DMU, notamment en terme de largeur de vague, de déplacement de potentiel de pic avec la vitesse de balayage et de stœchiométrie électronique. Le mécanisme est séquentiel, transfert d'électron et rupture de liaison ne sont pas concertés, le schéma 9 s'applique aussi à ces deux substrats.

Les voltamogrammes des cyclobutanes de configuration *anti* ne montrent qu'une seule vague à un potentiel supérieur à +2 V vs. ECS. Ces vagues sont plus fines (entre 60 et 75 mV à 0,1 V s⁻¹ contre 80 mV pour les dimères *syn*) et se déplacent moins vite en fonction de la

vitesse de balayage qu'avec le *c,s*-DMU \rightleftharpoons DMU, indiquant de nouveau un mécanisme *E* (électron) + *C_I* (réaction chimique de premier ordre) séquentiel, avec un contrôle cinétique mixte entre le transfert de charge et la réaction chimique. Le mécanisme suivi est similaire à celui décrit plus haut : une première oxydation impliquant deux électrons mène à la rupture du cycle, mais au potentiel auquel cette réaction a lieu, le DMU neutre est immédiatement oxydé suivant un mécanisme biélectronique. La coupure du cycle et l'oxydation de la base neutre se font le long d'une seule et même vague impliquant 4 électrons par molécule oxydée. Cela n'altère en rien le caractère séquentiel du processus suivi.

3.1.2) Estimation des potentiels standard

Cas des dimères de configuration syn

La cinétique du processus oxydatif est conjointement contrôlée, à faible vitesse de balayage, par le transfert électronique et la réaction chimique consécutive. Pour ces dimères l'augmentation de la vitesse de balayage à quelques centaines de millivolts par secondes suffit pour que le transfert d'électron devienne très lent par rapport à la réaction chimique, ce qui se traduit sur l'allure des vagues par une largeur proche de 95 mV et un déplacement du pic de l'ordre de 60 mV par décade de $\log v$ ($\alpha \approx 0,5$). On peut alors relier le potentiel de pic au potentiel standard du couple dimère $^{\bullet+}$ / dimère par l'équation suivante, dans laquelle la constante de vitesse de coupure du radical cation n'intervient plus : ¹⁰

$$E_p = E_{\text{dimère}^{\bullet+} / \text{dimère}}^0 + 0,78 \frac{RT}{\alpha F} - \frac{RT}{\alpha F} \ln \left\{ k_s^{\text{app}} \left(\frac{RT}{\alpha F v D} \right)^{1/2} \right\} \quad (8)$$

où α est le coefficient de symétrie, D le coefficient de diffusion du substrat et k_s^{app} la constante de vitesse apparente du transfert d'électron.

L'évaluation de $E_{\text{dimère}^{\bullet+} / \text{dimère}}^0$ nécessite d'estimer k_s^{app} , la constante de vitesse apparente de transfert d'électron. Il faut donc se positionner sur la description de la cinétique du transfert d'électron. On utilise une relation de type Marcus, dans laquelle l'enthalpie libre d'activation ΔG^\ddagger dépend de façon quadratique de l'enthalpie libre standard ΔG^0 . ¹³ Cette relation s'applique bien aux transferts de type sphère externe, comme c'est le cas ici. Pour une oxydation :

$$k = Z e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad \text{et} \quad \Delta G^\ddagger = \Delta G_0^\ddagger \left(1 - \frac{\Delta G^0}{4\Delta G_0^\ddagger} \right)^2$$

Avec $\Delta G^0 = -F(E - E^0 - \Phi_2)$, où E est le potentiel de l'électrode, E^0 le potentiel standard de la réaction, c'est-à-dire le potentiel standard du couple dimère^{•+} / dimère, et Φ_2 le potentiel au plan externe de Helmholtz. La barrière d'activation intrinsèque vaut $\Delta G_0^\ddagger \simeq \lambda_0 / 4$, où λ_0 est l'énergie de réorganisation du solvant autour du dimère due au transfert électronique. Si ΔG^0 est petit, c'est-à-dire si $E - \Phi_2$ est proche du potentiel standard E^0 , on peut linéariser (au premier ordre) la relation activation / force motrice au premier ordre, ce qui conduit à :

$$\Delta G^\ddagger \simeq \frac{\lambda_0}{4} - \frac{F}{2}(E - E^0 - \Phi_2)$$

On en déduit :

$$k = Ze^{-\lambda_0/4RT} e^{-(F/2RT)\Phi_2} e^{(F/2RT)(E-E^0)} = k_s^{\text{app}} e^{(F/2RT)(E-E^0)}$$

Avec

$$k_s^{\text{app}} = Ze^{(-\lambda_0/4RT)} e^{(-F/2RT)\Phi_2} \quad (9)$$

Le facteur préexponentiel Z est le facteur de collision hétérogène, il ne dépend que de la masse molaire du substrat : $Z = \sqrt{RT/2\pi M}$. λ_0 , l'énergie de réorganisation du solvant, peut être calculée par une approche de type Marcus – Hush. Elle est inversement proportionnelle au rayon, avec un facteur de proportionnalité qui dépend des constantes diélectriques optique et statique du solvant. $\lambda_0 = e_0^2 \left(\frac{1}{D_{\text{op}}} - \frac{1}{D_s} \right) \frac{1}{na}$, D_{op} et D_s étant les constantes diélectriques optique et statique, respectivement, et $n = 4$ (Marcus).¹⁴ Ce facteur de proportionnalité a été ajusté empiriquement dans l'acétonitrile : $\lambda_0 = 3/a$, où a est exprimé en Å et λ_0 en eV. Avec les cyclobutanes modèles, $\lambda_0 \approx 0,65$ eV. Pour les potentiels d'électrode mis en jeu, Φ_2 est compris entre 0,15 et 0,2 V.¹⁵ L'application de l'équation (9) permet finalement d'aboutir à la valeur suivante : $k_s^{\text{app}} = 0,19 \pm 0,09$ cm s⁻¹. L'incertitude provient principalement de l'incertitude sur λ_0 .

Cette valeur est alors utilisée pour calculer les potentiels standard via l'application de l'équation (8). Pour chaque dimère *syn* on effectue le calcul à une vitesse de balayage suffisamment élevée pour que la cinétique ne soit contrôlée que par le transfert de charge (typiquement 1 V s⁻¹) en tenant compte de l'incertitude sur la valeur de k_s^{app} . Le coefficient de diffusion des dimères dans l'ACN a été estimé à $1,25 \times 10^{-5}$ cm² s⁻¹. Les potentiels standard estimés sont rassemblés dans le tableau 2. Les potentiels standard d'oxydation des cyclobutanes de configuration *syn* sont assez proches des potentiels de pic mesurés, ce qui

justifie à posteriori l'utilisation de l'équation (9) (force motrice ΔG^0 petite). Par ailleurs, les constantes de vitesses k_s^{app} obtenues ici sont proches des estimations de la littérature pour des molécules de taille similaire.

Cas du cis,anti-DMU \rightleftharpoons DMU

En ce qui concerne ce dimère, on remarque qu'il y a un contrôle cinétique mixte entre le transfert de charge et la réaction chimique consécutive, dans la gamme des vitesses de balayage explorée. Cela signifie que les courbes dépendent conjointement de la thermodynamique de la réaction (E^0 , potentiel standard de formation du radical cation du dimère) et des deux constantes cinétiques impliquées (k_s^{app} pour le transfert d'électron, et k_c pour la réaction chimique consécutive), ce qui se manifeste à travers les valeurs de deux observables que sont le potentiel de pic et la largeur des vagues. Dans ce régime cinétique, on peut donc extraire deux paramètres qui relient le potentiel standard et les deux constantes de vitesses évoquées ci-dessus : ¹⁰

$$C_1 = \frac{Fk_c D^2}{2RT(k_s^{\text{app}})^4} \quad \text{et} \quad C_2 = E^0 - \frac{RT}{F} \ln 10 \times \log \left(\frac{2k_c D}{(k_s^{\text{app}})^2} \right) \quad (10)$$

où D est le coefficient de diffusion du substrat ($1,25 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). Les valeurs numériques de C_1 et C_2 sont obtenues par ajustement aux courbes théoriques des variations de E_p et de $E_p - E_{p/2}$ avec la vitesse de balayage, de façon à obtenir un bon accord sur l'ensemble des vitesses explorées. ¹⁶ On prend $\alpha \approx 0,5$ et il vient $C_1 = 6,31 \text{ s V}^{-1}$ et $C_2 = 2,0 \text{ V}$. Connaissant les valeurs de C_1 et C_2 , ainsi que celle de k_s^{app} ($0,19 \pm 0,09 \text{ cm s}^{-1}$) il nous est désormais possible de calculer k_c et E^0 :

$$E^0 \approx 2,187 \pm 0,030 \text{ V vs. ECS} \quad \text{et} \quad k_c \approx 2,6 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$$

Tableau 2. Estimation des potentiels standards pour l'oxydation des dimères d'uracile et de thymine.

Composé	$E_{\text{dimère}^{\bullet+}/\text{dimère}}^0$ (V vs. ECS)
<i>c,s</i> -DMU \rightleftharpoons DMU	$1.815 \pm 0,030$
<i>c,s</i> -DMT \rightleftharpoons DMT	$1.810 \pm 0,030$
<i>t,s</i> -DMU \rightleftharpoons DMU	$1.830 \pm 0,030$
<i>c,a</i> -DMU \rightleftharpoons DMU	$2,187 \pm 0,030$

3.1.3) Influence de la configuration du cycle

Les résultats rassemblés dans le tableau 2 permettent de vérifier directement l'influence de la configuration du cycle sur l'oxydation du dimère de DMU. La configuration *cis* ou *trans* n'a que peu d'effet sur le transfert d'électron oxydatif vis à vis des cyclobutanes. En effet, 15 mV seulement séparent les potentiels standard de *c,s*-DMU \leftrightarrow DMU et *t,s*-DMU \leftrightarrow DMU, le radical cation du dérivé *c,s* étant très légèrement plus stable. Ceci indique un caractère liant légèrement plus prononcé pour l'orbitale HOMO du dérivé *c,s*.

Par contre, la configuration *syn* ou *anti* a un effet beaucoup plus marqué sur l'oxydation des cyclobutanes. Le potentiel standard d'oxydation du *c,a*-DMU \leftrightarrow DMU est 372 mV plus positif que celui du *c,s*. Le transfert d'électron se fait donc beaucoup moins facilement avec les cyclobutanes *anti* que les *syn*, en accord avec les observations expérimentales de l'équipe d'Uta Wille.⁸ Une explication avancée dans la littérature est l'existence d'interactions stabilisantes entre les doublets des deux atomes d'azote (interactions dites "through bond" à travers les liaisons σ dont l'effet serait d'abaisser l'énergie de l'orbitale HOMO).⁶ De telles interactions seraient favorisées dans les cyclobutanes de configuration *syn* car les doublets impliqués y sont séparés par une seule liaison σ , et l'angle diédral est faible. Au contraire, dans les cyclobutanes de configuration *anti* les doublets des atomes d'azote sont séparés par deux liaisons σ et la géométrie de la molécule ne favorise pas les interactions décrites ci dessus. Nos propres calculs quantiques sur les formes neutres du *t,s*-U \leftrightarrow U (U: Uracile) et *t,a*-U \leftrightarrow U ne confirment pas cette interprétation qualitative. Les orbitales HOMO semblent plutôt montrer une interaction "through space" entre les atomes d'azote pour le dimère *syn*.

3.1.4) Origine de la barrière d'activation

Des calculs quantiques ont été faits sur des dimères de type cyclobutane d'uracile et de thymine, le *c,s*-U \leftrightarrow U et le *c,s*-T \leftrightarrow T. Au niveau UHF/6-31G*, la comparaison des structures du *c,s*-U \leftrightarrow U à celle de son radical cation permet la mise en évidence d'un allongement de la liaison C(6)–C(6') suite à la perte d'un électron, ce qui suggère que cette liaison est la première à se couper. Les résultats suggèrent également que la coupure du cycle à quatre atomes se fait de manière séquentielle, les liaisons C(6)–C(6') et C(5)–C(5') se coupant en deux étapes successives.^{17,18} De même, des calculs au niveau CASSCF/6-31G indiquent que la rupture de *c,s*-T \leftrightarrow T $^{\bullet+}$ se fait de manière séquentielle, avec passage de deux barrières correspondant à la rupture des liaisons C(6)–C(6') puis C(5)–C(5'). Il apparaît que la

deuxième barrière est supérieure à la première. Des calculs aux niveaux AM1 et MP2 indiquent également un mécanisme séquentiel dans lequel la première liaison coupée est la C(6)–C(6'). Au niveau B3LYP, ce processus se fait avec coupure simultanée des deux liaisons. Ces résultats ont été obtenus en phase gazeuse, et la prise en compte du solvant (eau) via des calculs SCRF/B3LYP/6-31G* stabilise les intermédiaires réactionnels identifiés.¹⁹ Il en résulte que les barrières calculées sont plus exothermiques qu'en phase gaz, mais les formes globales des courbes d'énergie potentielle ne sont pas modifiées.¹⁹

Présentation des calculs

L'oxydation des cyclobutanes a été modélisée par des calculs menés sur le radical cation $A^{\bullet+}$, pris comme modèle simplifié des composés étudiés (voir schéma 10). Quelques remarques préliminaires sont nécessaires pour justifier ce choix. Il a été très difficile d'obtenir des structures réduites ou oxydées stables des dimères étudiés, en particulier pour les dimères de pyrimidine. Aussi nous avons dû travailler sur des structures modèles plus petites, conservant les principales caractéristiques structurales (site supposé de l'oxydation) et géométriques (plan du motif cyclobutane perpendiculaire au plan de l'uracile) des dimères ainsi modélisés.

Ces calculs ont été effectués au niveau B3LYP/6-31G* (méthode de type DFT) dans le but d'aboutir à une description qualitative du processus de coupure des radicaux cations, et non pour accéder à des valeurs quantitativement significatives des barrières d'activation franchies. Notre objectif est de vérifier la faisabilité du mécanisme que nous proposons. Ces calculs peuvent aussi nous aider à comprendre l'origine de la barrière d'activation à franchir pour rompre la liaison C(6)–C(6') après l'oxydation des cyclobutanes. Une description plus détaillée des méthodes de calcul employées est faite à l'annexe 4.

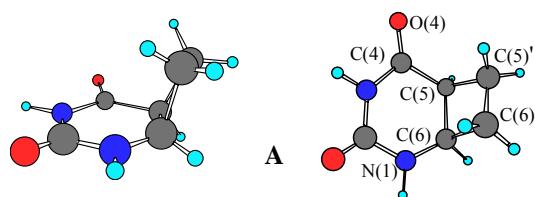


Schéma 10. Composé modèle A pour modéliser l'oxydation des cyclobutanes.
Atomes : gris, carbone ; rouge, oxygène ; bleu, azote ; bleu clair, hydrogène.

Résultats

A la géométrie d'équilibre du radical cation, 42 % de la densité de spin est localisée sur l'azote N(1) adjacent au cycle à quatre atomes, ce qui appuie l'idée selon laquelle cet atome est le site d'oxydation des cyclobutanes. Un état de transition a été identifié connectant

d'une part au radical cation à l'équilibre, d'autre part aux fragments coupés (éthène et radical cation de l'uracile). A l'état de transition, la principale déformation géométrique est l'allongement de la liaison C(6)–C(6') dont la longueur est passée de 1,791 à 1,95 Å. Simultanément la densité de spin sur le N(1) a diminué de 42 % à 31 % tandis qu'elle a augmenté sur le carbone C(6'), passant de 35 % à 50 %. Il se produit un transfert d'électron intramoléculaire vers l'orbitale σ^* de la liaison C(6)–C(6') en même temps que cette liaison se coupe homolytiquement. Ce transfert d'électron intramoléculaire est possible car les deux orbitales impliquées peuvent se mélanger sans restriction de symétrie (liaison C–C perpendiculaire au plan contenant l'azote). L'enthalpie libre d'activation ΔG^\ddagger , calculée comme la différence d'enthalpie entre la géométrie d'équilibre et l'état de transition, vaut 0,03 eV. L'introduction d'un solvant (acétonitrile) via une méthode de solvation de type continuum diélectrique (COSMO) modifie peu cette valeur, qui passe à 0,04 eV, ce qui traduit une plus forte localisation de la charge au niveau du radical cation à l'équilibre. Une fois l'état de transition passé, la liaison C(5)–C(5') se coupe homolytiquement sans barrière à ce niveau de calcul. Nous avons vérifié que le processus de coupure le long duquel la liaison C(5)–C(5') serait cassée la première était très défavorable.

Coupure homolytique

Il est intéressant, à ce niveau, de dire quelques mots sur la modélisation des coupures homolytiques des radicaux et ions radicaux ($\cdot A \cdot B \rightarrow A\cdot + \cdot B$) qui peut être exergonique, avec passage d'une barrière d'activation, comme c'est le cas ici. L'origine de cette barrière d'activation a été comprise en confrontant les résultats expérimentaux obtenus lors de la réduction électrochimique d'une famille de 4-cyano-phényl-alkyle éthers à ceux d'une part résultant d'une modélisation par calcul quantique des surfaces d'énergie potentielle liées au processus de coupure de liaison carbone-oxygène, et d'autre part à ceux d'une modélisation semi-empirique consistant en la détermination de l'intersection des deux surfaces associées respectivement à la dissociation d'un état liant ($\cdot A \cdot B \rightarrow \cdot A \cdot + \cdot B$) et à l'approche à des distances de liaison d'un état purement répulsif associé aux produits de coupure ($A\cdot + \cdot B \rightarrow A\cdot\cdot B$).²⁰ Les énergies des différents états peuvent être modélisées par des courbes de Morse (schéma 11). La barrière expérimentale observée résulte d'une réorganisation nucléaire λ_i liée au transfert intramoléculaire d'un électron entre une orbitale de type π^* et l'orbitale σ^* de la liaison coupée, à laquelle s'ajoute une énergie de réorganisation additionnelle λ_0 liée au

solvant, en raison du changement de répartition de la densité de charge entre l'intermédiaire et les fragments coupés.

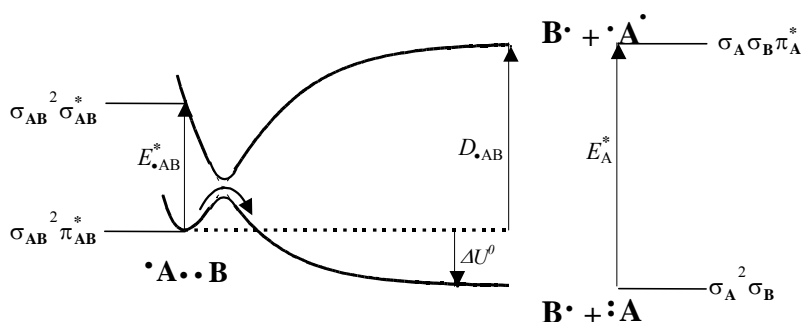


Schéma 11. Modélisation de la coupure homolytique d'une liaison A-B dans le radical •AB.

La coupure homolytique équivaut donc à un transfert d'électron dissociatif intramoléculaire, auquel la théorie du transfert d'électron dissociatif intermoléculaire peut-être appliquée. Il a également été montré que la barrière d'activation est quadratique :

$$\Delta G^\ddagger \cong \frac{\lambda_i + \lambda_0}{4} \left(1 + \frac{\Delta G^0}{\lambda_i + \lambda_0} \right)^2 (-H) \text{ avec } \lambda_i = \frac{E_A^* + E_{AB}^*}{2}. H \text{ est l'énergie de résonance.}$$

3-2 Oxydation des oxétanes

Les résultats obtenus par voltamétrie cyclique sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 3. Résultats de la voltamétrie pour l'oxydation des oxétanes.

Oxétane	E_p^a	ΔE^b	$\partial E_p / \partial \log v^c$	n^d
1	1,77	75	52	1,95
2	1,70	65	44	2,20
3	1,60 ₅	55	43	1,85
4	1,44 ₅	45	44	1,35 ^e

a: en V vs. ECS, à 0,1 V s⁻¹. b: largeur de vagues à mi-hauteur ($E_p - E_{p/2}$) à 0,1 V s⁻¹. c: en mV / décade. d: stœchiométrie électronique. e: première vague d'oxydation

La largeur des vagues ainsi que le déplacement du potentiel de pic avec la vitesse de balayage montrent que les quatre oxétanes sont oxydés suivant un mécanisme $E + C_1$ séquentiel, le transfert d'électron et la réaction chimique consécutive ne sont pas concertés. La cinétique du processus est gouvernée conjointement par les deux étapes. Les différences observées sur les voltamogrammes des composés **1**, **2** et **3** d'une part, et **4** d'autre part, se traduisent par un mécanisme d'oxydation différent.

3.2.1) Mécanisme d'oxydation de l'oxétane 4

L'oxétane **4** est particulier car la partie aromatique du carbonyle cède un électron plus facilement que la partie diméthylthymine (notons par exemple, l'alcool 4-méthoxybenzylique s'oxyde à un potentiel moins positif que la diméthylthymine). C'est sur cette partie de la molécule que l'oxydation a lieu. Le processus suivi est résumé dans le schéma 12. Suite à l'oxydation de la fonction méthoxy, la liaison C–C du cycle à 4 atomes est rompue, puis la liaison C–O se coupe. Rien ne permet d'affirmer que ces deux coupures sont bien distinctes et non simultanées, comme indiqué par une flèche en pointillé sur le schéma. Ces deux coupures aboutissent à la formation d'une monobase thymine méthylée neutre et du radical cation de l'anisaldéhyde.

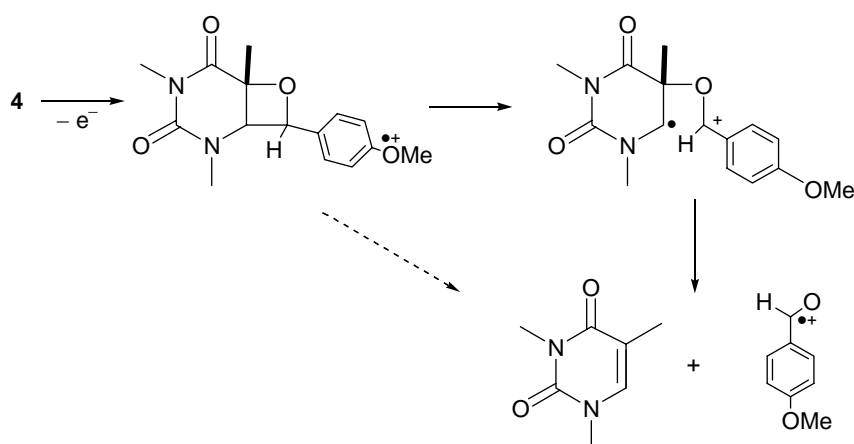


Schéma 12. Mécanisme d'oxydation de l'oxétane 4.

La présence de la DMT neutre est confirmée par la deuxième vague anodique, observée à + 1,85 V vs. ECS à 0,1 V s⁻¹ (voir annexe 1 pour une description détaillée de la voltamétrie de la DMT). La stœchiométrie électronique de la vague de l'oxétane est légèrement supérieure à 1 ($n_{\text{calculé}} = 1,35$). Le radical cation du p-méthoxybenzaldéhyde, formé en solution, est très instable, il réagit pour partie en solution et diffuse simultanément à l'électrode, où il est oxydé.

3.2.2) Mécanisme d'oxydation des oxétanes 1, 2 et 3. Mise en évidence de la régiosélectivité de l'oxydation des oxétanes modèles.

La stœchiométrie électronique de la vague anodique des oxétanes **1**, **2** et **3** ainsi que l'absence de la vague d'oxydation de la DMT neutre montre que la perte de l'électron se fait sur la partie thymine. Nous proposons le mécanisme d'oxydation illustré sur le schéma 13.

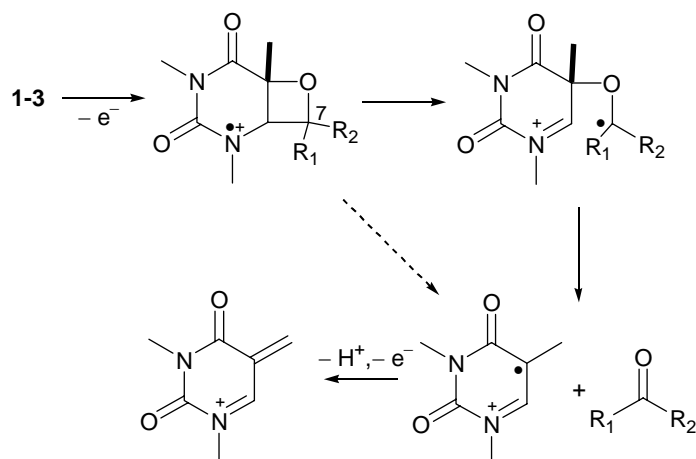


Schéma 13. Mécanisme d'oxydation des oxétanes 1 à 3.

L'oxydation de la partie thymine mène aux coupures des liaisons C–C puis C–O du cycle. Là encore, rien n'indique que ces deux liaisons ne sont pas coupées de manière simultanée, comme le suggère la flèche en pointillés. Ces deux ruptures successives aboutissent à la formation du composé carbonylé aromatique neutre et du radical cation de la diméthylthymine, qui perd un proton et forme un cation imminium, déjà oxydable au potentiel auquel la réaction a lieu. Un indice expérimental du mécanisme proposé a été obtenu lors de l'oxydation de l'oxétane **3**. En balayant jusqu'à des potentiels très positifs (supérieurs à 2,5 V vs. ECS) on a observé une deuxième vague anodique, dont le potentiel (2,43 V) est proche du potentiel d'oxydation du carbonyle aromatique précurseur (ici le p-méthylbenzaldéhyde, figure 17). Ce mécanisme a déjà été suggéré par Falvey, dont l'étude de l'oxydation de **1** et **2** par un accepteur homogène photoexcité a lieu sur la partie DMT, et mène à la coupure du motif oxétane avec formation du radical cation de la diméthylthymine.⁹

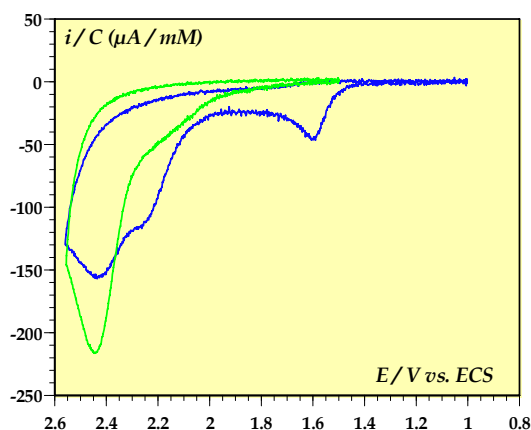


Figure 17. Oxydation de l'oxétane 3 et du p-méthylbenzaldéhyde sur une électrode de carbone vitreux dans ACN. Bleu : oxétane 3, $C = 1,67 \text{ mM}$; vert : p-méthylbenzaldéhyde, $C = 1,70 \text{ mM}$; $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

3.2.3) Estimation des potentiels standard

L'augmentation de la vitesse de balayage à quelques centaines de volts par seconde déforme la vague d'oxydation des oxétanes, ce qui rend impossible l'observation d'une vague réversible qui nous permettrait d'évaluer directement le potentiel standard de la formation du radical cation ainsi que la constante de vitesse de sa coupure. Néanmoins, la largeur des vagues et le déplacement de leur potentiel de pic avec la vitesse de balayage indiquent que la cinétique du processus d'oxydation est contrôlée conjointement par le transfert d'électron et par la réaction chimique qui suit, ce qui implique que les courbes dépendent de la thermodynamique (E^0) et des deux constantes de vitesses mises en jeu (k_s^{app} pour le transfert d'électron, et k_c pour la réaction chimique consécutive), ce qui se manifeste à travers les deux observables que sont le potentiel de pic et la largeur des vagues. On peut donc utiliser la même méthode qu'avec le *c,a*-DMU \rightleftharpoons DMU et extraire les deux paramètres C_1 et C_2 exprimés dans l'équation (10).¹⁶ Avec les oxétanes **1** et **2**, l'ajustement aux courbes théoriques des variations de E_p et de $E_p - E_{p/2}$ avec la vitesse de balayage (figure 18), de façon à obtenir un bon accord sur l'ensemble des vitesses explorées, en prenant $\alpha \approx 0,5$, mène aux valeurs suivantes : pour l'oxétane **1**, $C_1 = 158 \text{ s V}^{-1}$ et $C_2 = 1,64 \text{ V}$, et pour l'oxétane **2**, $C_1 = 3,98 \text{ s V}^{-1}$ et $C_2 = 1,65 \text{ V}$. La valeur de k_s^{app} a été estimée à $0,20 \pm 0,10 \text{ cm s}^{-1}$ pour ces deux composés, par application de l'équation (9). Là encore, l'incertitude sur k_s^{app} vient essentiellement de l'incertitude sur λ_0 .

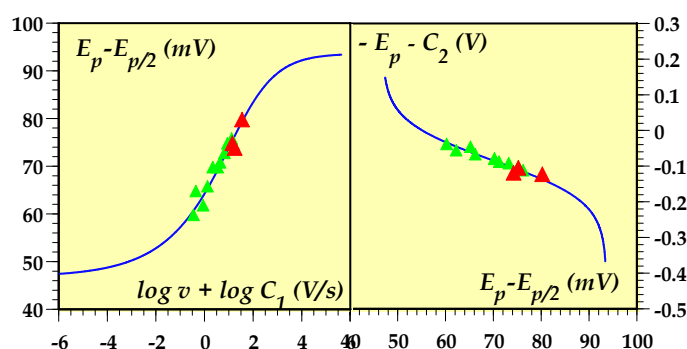


Figure 18. Voltamétrie cyclique des oxétanes **1** (2,39 mM, rouge) et **2** (1,08 mM, vert) sur une électrode de carbone vitreux dans ACN.

Gauche: variation de la largeur de pic avec la vitesse de balayage. Droite: variation du potentiel de pic avec la largeur de pic. Les courbes en trait plein représentent les variations théoriques.

Connaissant les valeurs de C_1 , C_2 et k_s^{app} pour les oxétanes **1** et **2**, on peut en déduire les valeurs de E^0 et k_c . Les potentiels standard de **1** et **2** sont $1,92 \pm 0,03$ et $1,84 \pm 0,03 \text{ V vs. ECS}$ respectivement, les constantes de coupure s'élèvent à $1,0 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ pour **1**^{•+} et $2,2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ pour **2**^{•+}. Ces valeurs sont très proches de celles trouvées pour les cyclobutanes de

configuration *syn*, ce qui appuie l'idée que les oxétanes **1** et **2** sont oxydés suivant un mécanisme très similaire.

3.2.4) Modélisations quantiques

De même qu'avec les cyclobutanes, des calculs semi-empirique (niveaux AM1 et PM3) ont été faits par Taylor et al. pour essayer de mimer l'oxydation de modèles issus de la cycloaddition de deux thymine (schéma 14).²¹ Ils indiquent que la perte d'un électron entraîne la rupture séquentielle du motif oxétane, avec la coupure dans un premier temps de la liaison C(6)–C(4'), puis dans un second temps de la liaison C(5)–O. Les deux ruptures de liaison sont caractérisées par une barrière d'activation.

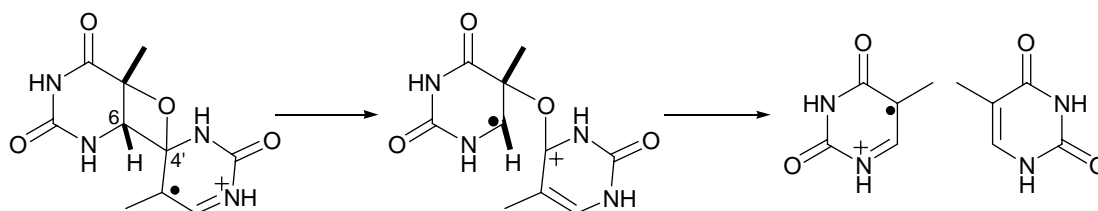


Schéma 14. Coupure du radical cation d'un oxétane modèle.

Nous avons fait des calculs quantiques au niveau B3LYP/6-31G* sur les radicaux cations des composés modèles **B** et **C** illustrés dans le schéma 15. Le composé **B** est un bon mime de l'oxétane **4** car leurs structures diffèrent essentiellement par le remplacement d'un groupe méthyle en C(5) par un atome d'hydrogène. L'optimisation du radical cation **B**^{•+} permet d'aboutir à une géométrie d'équilibre dans laquelle l'essentiel de la densité de spin (74 %) est localisée sur la partie p-méthoxybenzyle.

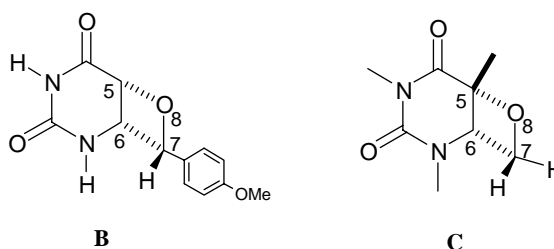


Schéma 15. Composés modèles des oxétanes étudiés.

Nous avons pu caractériser un état de transition (**TS**) reliant à la géométrie d'équilibre d'un côté, à l'uracile et au radical cation du p-méthoxybenzaldéhyde de l'autre. De la géométrie d'équilibre jusqu'à **TS**, la longueur de la liaison C(6)–C(7) s'allonge de 1,667 à 2,022 Å alors que la densité de spin localisée sur le phényle diminue (39 %) au profit d'une densité en C(6), qui croît de 7 à 27 %. L'enthalpie libre d'activation ΔG^\ddagger vaut 0,087 eV, la prise en compte du

solvant (ACN) à travers un calcul COSMO aboutit à une augmentation de la barrière (0,19 eV), ce qui indique, comme pour $\mathbf{A}^{\bullet+}$, que la charge est plus localisée au niveau du radical cation à l'équilibre qu'à **TS**. Aucun autre minimum n'a été détecté sur le chemin réactionnel qui mène à l'uracile et au radical cation du p-méthoxybenzaldéhyde (figure 19).

Pour rendre compte de l'oxydation des oxétanes **1** à **3**, on fait des calculs sur le composé **C** dans lequel aucun groupe aromatique n'est attaché en C(7). Une géométrie d'équilibre est trouvée pour $\mathbf{C}^{\bullet+}$, pour laquelle 70 % de la densité de spin est localisée sur la partie uracile. En d'autres termes, l'oxydation se produit au niveau du motif pyrimidine. Un état de transition a été trouvé, connectant au radical cation de l'uracile et au formaldéhyde. En **TS**, la liaison C(6)–C(7) s'est étirée de 1,553 à 2,032 Å. Dans le même temps, la densité de spin se concentre principalement sur l'atome C(7) de la liaison en train de se couper (56 %). L'énergie d'activation s'élève à 0,219 eV et la prise en compte du solvant par un calcul de type COSMO (ACN) n'augmente que marginalement la hauteur de la barrière (0,237 eV). Comme pour $\mathbf{B}^{\bullet+}$, aucune barrière énergétique n'a été trouvée pour la rupture de la liaison C–O.

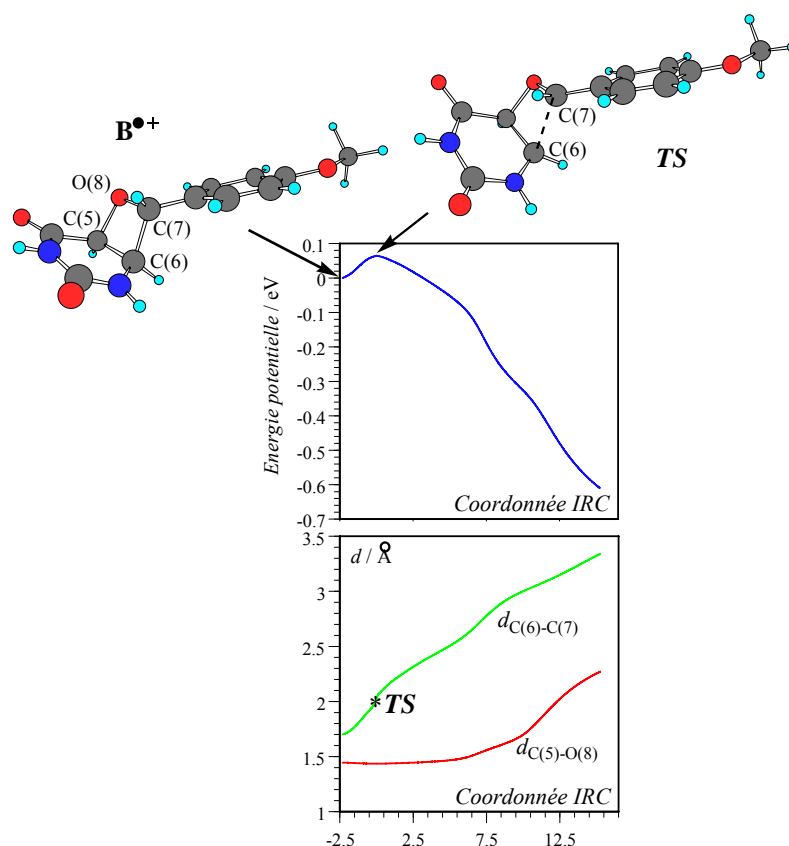


Figure 19. Energie potentielle en phase gazeuse pour la coupure oxydative de $\mathbf{B}^{\bullet+}$ (haut). Variation des longueurs de liaison caractéristiques pendant la coupure (bas). Coordonnée IRC en $\text{u}^{-1/2} a_0$. Atomes : gris, carbone ; rouge, oxygène ; bleu, azote ; bleu clair, hydrogène.

Les calculs menés sur les modèles **B** et **C** renforcent nos conclusions expérimentales. Leur oxydation suit un processus rétro-Paterno-Büchi aboutissant à la reformation de l'uracile et du radical cation du p-méthoxybenzaldéhyde pour **B**, et de l'uracile (sous forme de radical cation) et du formaldéhyde pour **C**. Il y a une barrière d'activation pour la coupure de la liaison C–C, qui trouve son origine dans un transfert d'électron intramoléculaire entre une orbitale de type π et l'orbitale σ^* de la liaison C(6)–C(7). Nous n'avons pas identifié de barrière pour la coupure de la liaison C(5)–O(8), ce qui renforce l'idée que l'étape chimique C_I , qui contrôle partiellement l'oxydation des oxétanes **1-4**, est bien la coupure de la liaison carbone-carbone.

3-3 Comportement du thiétane

Notre étude de l'oxydation du thiétane à une électrode a été faite en milieu aprotique (DMF) avec 3,5 % d'eau, de façon à solubiliser le substrat. La vague anodique que nous avons obtenue indique un mécanisme impliquant la perte de quatre électrons par molécule oxydée et son potentiel de pic correspond à la gamme de potentiels d'oxydation des fonctions sulfure aliphatique ou cyclique, il est donc fort probable que le thiétane étudié soit oxydé en sulfoxyde, après avoir perdu deux électrons et deux protons, puis ce sulfoxyde perd à son tour deux électrons et deux protons pour aboutir à une sulfone.¹²

Conclusion

L'oxydation à une électrode des différents composés modèles de lésions photoinduites de l'ADN provoque la coupure du cycle à quatre atomes pour tous les composés, excepté le thiétane, pour lequel l'atome de soufre est oxydé en sulfone. Ces coupures oxydatives se font séquentiellement, un radical cation se forme transitoirement puis se fragmente homolytiquement via une barrière d'activation qui trouve son origine dans un transfert d'électron intramoléculaire. L'oxydation des cyclobutanes se fait au niveau de l'azote N(1) adjacent au motif cyclobutane à couper et mène à la formation des deux bases pyrimidiniques méthylées, l'une neutre et l'autre sous forme de radical cation. Ce dernier perd un deuxième électron et un proton pour former un cation imminium qui est ensuite hydrolysé. Les cyclobutanes de configuration *syn* sont oxydés beaucoup plus facilement que ceux de

configuration *anti*. L'oxydation des oxétanes a mis en lumière un effet de régiosélectivité du transfert d'électron, influencé par la nature des substituants présents sur le carbonyle aromatique précurseur. Pour l'oxétane **4**, l'oxydation se fait sur la partie aromatique du carbonyle, la rupture du cycle mène à la formation de son radical cation et de la DMT neutre. Pour les oxétanes **1**, **2** et **3** l'oxydation a lieu sur la partie DMT et les produits formés sont le carbonyle aromatique neutre et le radical cation de la DMT. La régiosélectivité du transfert d'électron a donc un impact direct sur la nature des produits de la coupure de l'oxétane. C'est toujours la liaison C–C du cycle à quatre atomes qui se coupe en premier.

Toutes les coupures de cycles observées sont dues à un transfert d'électron intramoléculaire depuis une orbitale de type π^* vers l'orbitale σ^* de la liaison C–C qui se rompt, qui est à l'origine de l'essentiel de la barrière d'activation à franchir pour arriver aux produits de la coupure. Cette hypothèse est soutenue par des calculs quantiques sur des modèles simplifiés, qui confirment également les mécanismes suggérés par l'électrochimie.

BIBLIOGRAPHIE

-
- ¹ Heelis, P. F., Deeble, D. J., Kim, S. T et Sancar, A. (1992) Splitting of a cis-syn cyclobutane thymine-thymine dimers by radiolysis and its relevance to enzymatic photoreactivation, *Int. J. Radiat. Biol.*, **62**, 137-143.
- ² Sancar, A. (1992) *Photolyase: DNA repair by photoinduced electron transfer*, dans *Advances in electron-transfer chemistry*; Mariano, P. S., Ed; JAI Press: New York; Vol. **2**, pp 215-272.
- ³ Rosenthal, I. Et Elad, D. (1968) Photosensitized monomerization of 1,3-dimethyluracil dimers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **32**, 599-601.
- ⁴ Roth, H. D. et Lamola, A. A. (1972) Cleavage of thymine dimers sensitized by quinones. Chemically induced dynamic nuclear polarization in radical ions. *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 1013-1014.
- ⁵ Ben-Hur, E. et Rosenthal, I. (1970) Photosensitized splitting of pyrimidines dimers. *Photochem. Photobiol.*, **11**, 163-168.
- ⁶ Pac, C., Kubo, J., Majima, T. et Sakurai, H. (1982) Structure-reactivity relationship in redox-photosensitized splitting of pyrimidine dimers and unusual enhancing effect of molecular oxygen, *photochem. Photobiol.*, **36**, 273-282.
- ⁷ Pouwels, P. J. W., Hartman, R. F., Rose, S. D. et Kaptein, R. (1995) Photo-CIDNP study of pyrimidine dimer splitting I: Reactions involving pyrimidine radical cation intermediates. *photochem. Photobiol.*, **61**, 563-574.
- ⁸ Krüger, O. et Wille, U. (2001) Oxidative cleavage of a cyclobutane pyrimidine dimer by photochemically generated nitrate radicals (NO_3^\bullet). *Org. Lett.*, **3**, 1455-1458.
- ⁹ Prakash, G. et Falvey, D. E. (1995) Model studies of the (6-4) photoproduct DNA photolyase : synthesis and photosensitized splitting of a Thymine-5,6-oxetane, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 11375-11376.
- ¹⁰ Nadjo, L. et Savéant, J. M. (1973) Linear sweep voltammetry : kinetic control by charge transfer and or secondary chemical reaction. I. Formal kinetics. *J. Electroanal Chem.*, **48**, 113-145.
- ¹¹ Joseph, A., Prakash, G. et Falvey, D. E. (2000) Model studies of the (6-4) photoproduct photolyase enzyme : laser flash photolysis studies confirm radical ion intermediates in the repair of thymine oxetane adducts, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11219-11225.

-
- ¹² (a) Svensmark, B., et Hammerich, O. (1990) Anodic oxidation of sulfur-containing compounds, dans *Organic electrochemistry, an introduction and a guide*, 3rd ed. Rev. and expanded; H. Lund and M. M. Baizer; Marcel Dekker, New York; pp 659-698. (b) Chambers, J. Q. (1978) Organic sulfur compounds, dans *Encyclopedia of electrochemistry of the elements*, vol 12; A. J. Bard and H. Lund; Marcel Dekker, New York; pp 329-502.
- ¹³ (a) Marcus, R. A. (1956) On the theory of oxidation-reduction involving electron transfer. I. *J. Chem. Phys.*, **24**, 966-978. (b) Hush, N. S. (1958) Adiabatic rate processes at electrodes. I. Energy-charge relationships, *J. Chem. Phys.*, **28**, 962-972. (c) Marcus, R. A. (1977) *Theory and applications of electron transfers at electrodes and in solution*, dans *Special Topics in Electrochemistry*, Rock, P. A., Ed.; Elsevier: New York; pp 161-179. (d) Marcus, R. A. et Sutin, N. (1985) Electron transfers in chemistry and biology, *Biophys. Biochim. Acta*, **811**, 265-322
- ¹⁴ Savéant, J.-M. (1990) Single electron transfer and nucleophilic substitution, *Adv. Phys. Org. Chem.*, **26**, 1-130.
- ¹⁵ Meneses, A. B., Antonello, S., Arévalo, M. C. et Maran, F. (2006) Double layer correction for electron-transfer kinetics at glassy carbon and mercury electrodes in *N,N*-dimethylformamide, *Electroanalysis*, **18**, 363-370.
- ¹⁶ Andrieux, C. P., Savéant, J.-M., Tallec, A., Tardivel, R. et Tardy, C. (1996) Solvent reorganization as a governing factor in the kinetics of intra molecular dissociative electron transfers. Cleavage of anion radicals of α -substituted acetophenones, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 9788-9789.
- ¹⁷ Harrison, C. B., O'Neil, L. L. et Wiest, O. (2005) Computational studies on DNA photolyase. *J. Phys. Chem. A*, **109**, 7001-7012.
- ¹⁸ Aida, M., Inoue, F., Kaneko, M. et Dupuis, M. (1997) An ab initio MO study on fragmentation reaction mechanism of thymine dimer radical cation. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 12274-12279.
- ¹⁹ Rak, J., Voityuk, A. A. et Rösch, N. (1998) Splitting of cyclobutane-type uracil dimer cation radicals. Hartree-Fock, MP2, and density functional studies. *J. Phys. Chem. A*, **102**, 7168-7175.
- ²⁰ Costentin, C., Robert, M. et Savéant, J.-M. (2003) Activation barriers in the homolytic cleavage of ions and ion radicals, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 105-112.

²¹ Wang, Y., Gaspar, P. P. et Taylor, J. S. (2000) Quantum chemical study of the electron-transfer-catalyzed splitting of oxetane and azetidine intermediates proposed in the photoenzymatic repair of (6-4) photoproducts of DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5510-5519.

CHAPITRE 2

Étude de la réaction biologiquement pertinente

Introduction

Lors de la photoréparation des lésions de l'ADN, l'enzyme photolyase transfère un électron vers la lésion. Ce processus réductif a été mis en évidence en 1993.¹ Nous allons nous intéresser dans ce chapitre à la réduction à une électrode des différents composés modèles des deux types de lésions photoinduites de l'ADN, en milieu organique aprotique, à savoir le diméthylformamide (DMF).

La réduction des mimes de lésions photoinduites de l'ADN a été étudiée dans des expériences de radiolyse, de photolyse et de transfert d'électron photoinduit (photolyse éclair), avec un donneur d'électron libre en solution ou accroché au substrat. La première mise en évidence de la coupure de cyclobutanes modèles par transfert d'électron réductif date de 1971, quand Hélène et Charlier ont irradié des dimères de type cyclobutane de thymine et d'uracile, avec le tryptophane et le 5-hydroxytryptophane comme donneurs en solution aqueuse.² La coupure d'un dimère de thymine a été observée également par radiolyse en solution aqueuse, la réaction étant initiée par un électron solvaté ou différents anions radicaux ($\text{CO}_2^{\bullet-}$, radical du propan-2-ol).³ Des expériences de photo-CIDNP (polarisation nucléaire dynamique induite photochimiquement) en milieu aqueux, ont montré l'existence du radical anion des dimères de DMU de configuration *anti*, suggérant que la réparation de ces modèles par transfert d'électron photoinduit se fait suivant un processus séquentiel.⁴ Dans une étude de la réduction photoinduite (photolyse éclair nanoseconde) de dimères de thymine et de DMT de configuration *cis,syn*, Falvey et al. ont mis en évidence une coupure réductrice et proposé le passage par un radical anion se coupant avec une vitesse proche de 10^6 s^{-1} (schéma 16).⁵

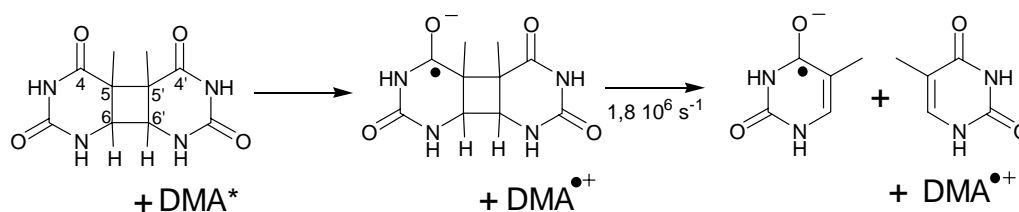


Schéma 16. Réduction homogène du *c,s-T* <> *T*.

La même équipe a étudié la réduction de dimères de DMT, de configurations *cis,syn* et *trans,syn* en milieu organique (ACN).⁶ Le dimère *trans* est plus facile à réduire que le dimère *cis*, avec une différence de 470 mV des potentiels de réduction estimés (– 1,73 et – 2,20 V vs. ECS pour le *t,s*-DMT <> DMT et le *c,s*-DMT <> DMT respectivement) sans que la nature des potentiels déterminés (potentiels standard ?) ne soit clairement explicitée. L'effet de la

configuration du cyclobutane a aussi été étudié par Carell et son équipe, avec les modèles présentés dans le schéma 17.⁷ Il s'agit de dimères d'uracile de type cyclobutane, auxquels est accrochée de façon covalente une flavine réduite et déprotonnée, qui sert de donneur d'électron. La réparation de ces modèles est déclenchée par irradiation avec une lampe à xénon (450 W) associée à un monochromateur ($\lambda = 366$ ou 400 nm) et suivie par HPLC. La coupure est moins efficace avec les dimères de configuration *trans*, ce qui reflète une meilleure stabilité de son radical anion relativement à celui du dimère de configuration *cis*.^{7a} On remarque que les rendements quantiques mesurés sont très inférieurs à ceux mesurés avec l'enzyme, atteignant 0,06 pour un dimère de configuration *cis* dans l'eau.^{7a} De même, les dimères d'uracile sont coupés deux fois plus vite que les dimères de thymine de même configuration.^{7b} Là encore l'explication suggérée est que le radical anion du dimère de l'uracile est moins stable que celui du dimère de la thymine.

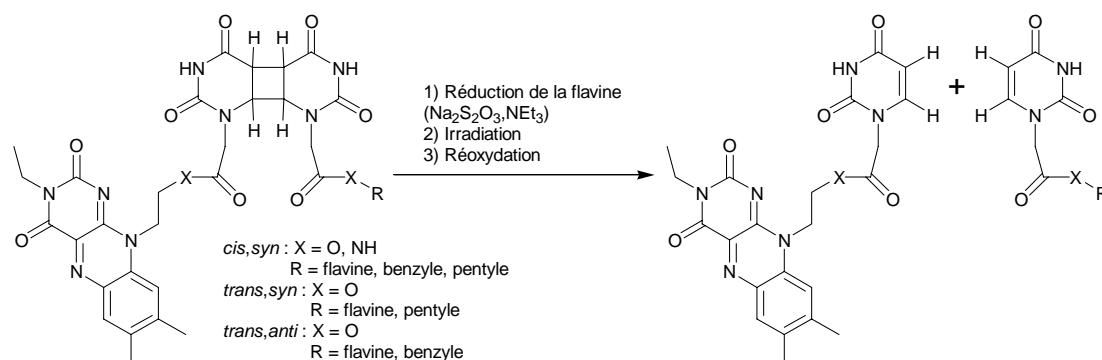


Schéma 17. Réduction homogène de modèles de cyclobutanes d'uraciles.

Une étude intéressante porte sur l'influence de la température sur la coupure réductrice de cyclobutanes issus de l'addition d'une thymine et d'un uracile, pontés par une chaîne alkyle au niveau de leur azote N(1) (schéma 18). La réparation, étudiée en milieu organique (EPA, éther diéthylique-isopentane-éthanol, ou PMM, poly(méthylméthacrylate)) à température ambiante et à 77 K, a été suivie par émission de fluorescence. A 77 K, le transfert d'électron se fait toujours, alors que la coupure n'est plus observée. Cela peut s'expliquer par une barrière d'activation à franchir pour la coupure du radical anion du cyclobutane.

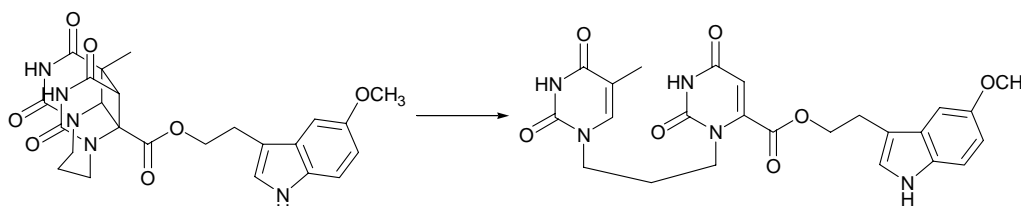


Schéma 18. Réparation du *c,s-T<>U*.

Les études de réduction de composés modèles d'adduits (6-4) sont plus rares. Falvey a étudié la réduction d'oxétanes modèles issus de la cycloaddition d'une pyrimidine N-méthylée (DMT ou DMU) et de carbonyles aromatiques, par photolyse laser éclair avec un donneur libre en solution (schéma 19).⁸ La réduction monoélectronique de ces oxétanes aboutit à leur rupture suivant un mécanisme rétro Paterno-Büchi, c'est-à-dire avec formation de la pyrimidine méthylée neutre, et du radical anion du carbonyle aromatique. Ces expériences ont mis en lumière un mécanisme séquentiel en deux étapes, le radical anion des modèles qui contiennent la DMT se coupant avec une constante de vitesse supérieure à $5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$.^{8a}

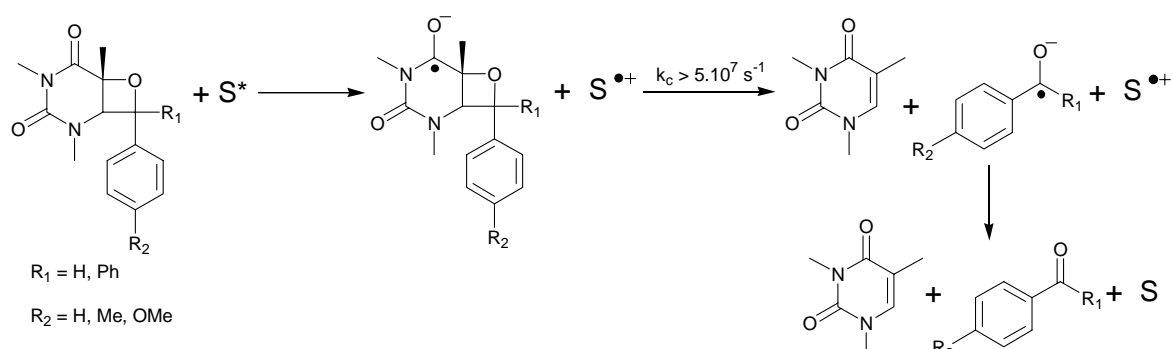


Schéma 19. Réduction d'oxétanes par transfert d'électron photoinduit avec un donneur libre en solution.

Carell a étudié la réduction par transfert d'électron photoinduit de composés modèles de la forme fermée des adduits (6-4) (oxétane et thiétane, schéma 20), en utilisant une flavine accrochée au substrat comme donneur d'électron.⁹ Ces expériences ont permis de vérifier qu'il y a coupure du cycle central suite à la réduction de l'oxétane et du thiétane (la réparation étant suivie par HPLC). La coupure n'a lieu que si la flavine est réduite et déprotonnée.^{9a} Ce résultat constitue un indice d'une similitude des modes d'action des photolyases ADN et des (6-4) photolyases.

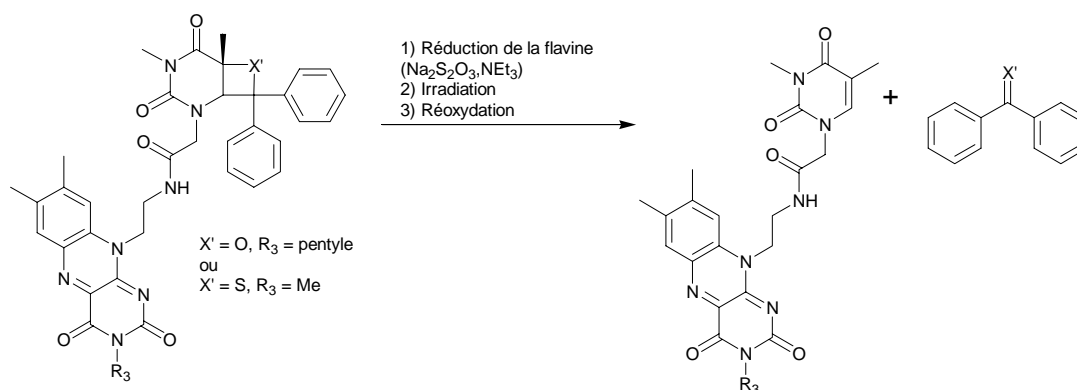


Schéma 20. Réduction d'un oxétane et d'un thiétane par transfert d'électron photoinduit avec une flavine accrochée au substrat.

La coupure du cycle a bien été observée expérimentalement, pour des cyclobutanes comme pour des oxétanes, suite à un transfert d'électron réductif photoinduit. L'étude de la

réduction de modèles de dimères de type cyclobutane par voltamétrie cyclique peut nous permettre de mettre en évidence la coupure du cycle et la re-formation des monobases thymine ou uracile, comme nous l'avons vu en oxydation. Les concepts de l'électrochimie moléculaire nous aideront alors à mieux comprendre le mécanisme de rupture du cycle, notamment en précisant si le processus de transfert d'électron coupure de liaison se fait en une ou deux étapes. Pour pouvoir observer un signal par électrochimie nous nous sommes placés en milieu organique aprotique, qui offre des conditions éloignées de celles dans lesquelles a lieu la réparation enzymatique. Nous discuterons donc de la pertinence de nos résultats vis à vis du mécanisme suivi de la réparation catalysée par la photolyase des dimères de thymine de type cyclobutane ou des adduits pyrimidine (6-4) pyrimidone. Nous tenterons ensuite d'expliquer les rendements quantiques observés avec les photolyases ADN et les (6-4) photolyases.

1 Réduction électrochimique des cyclobutanes

1-1 Composés de configuration *cis,syn*

De même qu'en oxydation nous avons étudié les *c,s*-DMU \rightleftharpoons DMU et *c,s*-DMT \rightleftharpoons DMT comme modèles des lésions photoinduites les plus fréquentes dans un brin d'ADN.

Un voltamogramme du *c,s*-DMU \rightleftharpoons DMU est présenté figure 20. Ce dimère se réduit le long d'une seule vague cathodique irréversible très négative ($-2,34$ V vs. ECS à $0,1$ V s $^{-1}$) et fine (45 mV de largeur à mi-hauteur à la même vitesse).

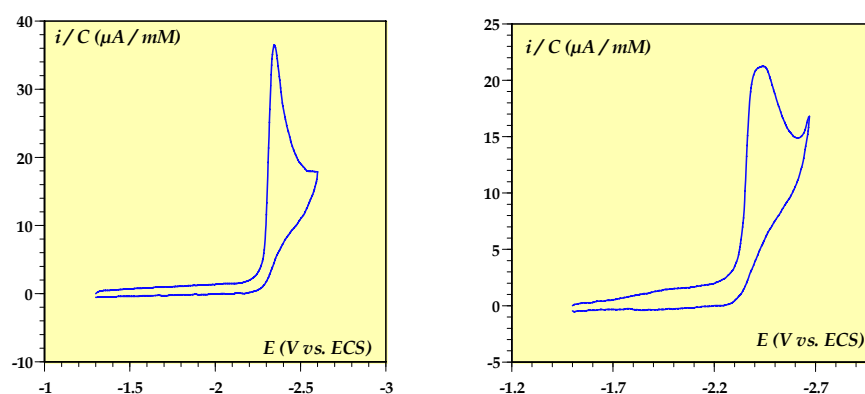


Figure 20. Réduction des modèles de configuration *cis,syn* à une électrode de carbone vitreux dans DMF. Gauche: *c,s*-DMU \rightleftharpoons DMU (1,70 mM). Droite: *c,s*-DMT \rightleftharpoons DMT (2,03 mM). $v = 0,1$ V s $^{-1}$.

Le potentiel de pic se déplace linéairement avec la vitesse de balayage avec une pente de -42 mV par décade, et dépend légèrement de la concentration du substrat, signe de l'interférence d'une réaction chimique de second ordre. La stœchiométrie électronique est toujours calculée par comparaison avec la vague d'oxydation réversible monoélectronique de la benzoquinone dans le même solvant (ici, le DMF) en appliquant l'équation (3). La vague est biélectronique ($n_{\text{calculé}} = 1,84$).

La réduction du $c,s\text{-DMT} \rightleftharpoons \text{DMT}$ montre que le changement de base entre uracile et thymine n'a pas beaucoup d'influence sur le mécanisme de réduction des cyclobutanes. Les voltamogrammes obtenus ne présentent qu'une seule vague cathodique très négative ($-2,45$ V vs. ECS à $0,1 \text{ V s}^{-1}$, figure 20) ayant une largeur à mi-hauteur d'environ 80 mV à basse vitesse. Son potentiel de pic varie linéairement avec la vitesse de balayage avec une pente de -62 mV par décade. Là encore la concentration du substrat a une influence sur le potentiel de pic de la vague, signe que la réaction chimique consécutive est d'ordre 2. La réduction du $c,s\text{-DMT} \rightleftharpoons \text{DMT}$ suit un mécanisme biélectronique ($1,74$ électrons par molécule réduite).

Le fait que les vagues cathodiques du $c,s\text{-DMU} \rightleftharpoons \text{DMU}$ et du $c,s\text{-DMT} \rightleftharpoons \text{DMT}$ soient biélectroniques est surprenant, car l'injection d'un seul électron devrait suffire pour casser le cycle. Une étude effectuée au laboratoire a montré que pour ces deux dimères, la monobase est réduite à un potentiel légèrement moins négatif que le dimère ($-2,32$ V pour le DMU contre $-2,34$ V pour son dimère, et $-2,41$ V pour le DMT contre $-2,45$ V pour son dimère, voir l'annexe 2). Il est donc possible que l'injection d'un électron provoque la coupure du cycle central et conduise à une monobase neutre et l'autre sous forme radicalaire anionique. La monobase neutre formée est alors réduite à l'électrode.

1-2 Influence de la configuration *cis* ou *trans*

Les voltamogrammes du $t,s\text{-DMU} \rightleftharpoons \text{DMU}$ ne présentent qu'une seule vague de réduction, elle se situe à $-2,34$ V vs. ECS à $0,1 \text{ V s}^{-1}$, sa largeur à mi-hauteur est alors de 45 mV. Le potentiel de pic varie à la fois avec la vitesse de balayage (-34 mV par décade) et avec la concentration en dimère. La stœchiométrie électronique est mesurée à $1,50$ électrons.

Il apparaît que le dimère *trans* est réduit au même potentiel et suivant le même mécanisme que le *cis*, indiquant que la configuration *cis* ou *trans* n'a que peu d'effet sur le transfert d'électron électrochimique vers les cyclobutanes.

1-3 Influence de la configuration *syn* ou *anti*

Pour illustrer l'influence de cette configuration nous avons étudié la réduction du *cis,anti*-DMU^{6Me} <> DMU^{6Me}, du *cis,anti*-DMU <> DMU et du *cis,anti*-DMT <> DMT.

Un voltamogramme du *c,a*-DMU^{6Me} <> DMU^{6Me} obtenu en réduction est montré figure 21. On n'observe qu'une seule vague cathodique à un potentiel très négatif, - 2,52 V vs. ECS à 0,1 V s⁻¹, avec une largeur à mi-hauteur égale à 55 mV à la même vitesse. Le potentiel de pic varie linéairement avec la vitesse de balayage à raison de - 39 mV par décade et montre une légère dépendance vis à vis de la concentration en dimère. La stœchiométrie électronique est de 2 électrons par molécule réduite ($n_{\text{calculé}} = 1,97$).

Le *c,a*-DMU <> DMU se réduit suivant une seule vague, irréversible, très négative (- 2,58 V vs. ECS à 0,1 V s⁻¹) et large de 80 mV. Le potentiel de pic varie avec log ν (- 50 mV par décade) et légèrement avec log C . La vague est biélectronique ($n_{\text{calculé}} = 1,85$).

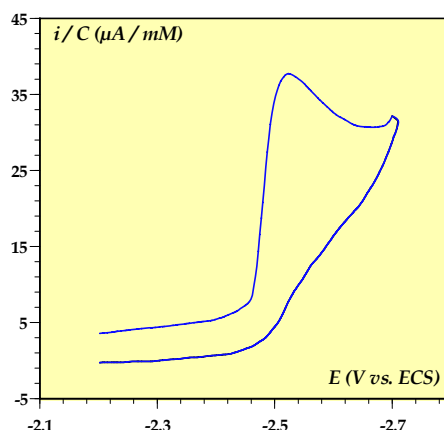


Figure 21. Réduction du *c,a*-DMU^{6Me} <> DMU^{6Me} sur une électrode de carbone vitreux dans DMF. $C = 1,01 \text{ mM}$, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

De même, les voltamogrammes du *c,a*-DMT <> DMT montrent une seule vague, irréversible, très négative (- 2,61 V vs. ECS à 0,1 V s⁻¹) et large de 80 mV à faible vitesse de balayage. Le potentiel de pic varie avec log ν (- 50 mV par décade) et légèrement avec log C . La vague est biélectronique ($n_{\text{calculé}} = 2,00$).

Ces résultats indiquent que les trois dimères de configuration *cis,anti* sont réduits suivant un mécanisme identique.

1-4 Vérification expérimentale de la coupure du cycle central

Les voltamogrammes des dimères en réduction ne permettent pas d'observer directement la coupure du cycle central, car la vague du monomère est moins négative que celle du dimère, quel que soit le cyclobutane étudié. Un moyen de vérifier expérimentalement

la coupure du dimère en réduction est d'en faire l'électrolyse à potentiel contrôlé. Nous avons vu dans le premier chapitre que la vague anodique des dimères de configuration *syn* est bien séparée de la vague du monomère. Nous avons tiré profit de cette observation pour suivre par voie électrochimique la réparation d'un dimère *syn* au cours d'une électrolyse, en vérifiant la diminution progressive du courant d'oxydation (le courant étant proportionnel à la concentration du substrat). L'électrolyse a été faite avec le *t,s*-DMU \rightleftharpoons DMU, à un potentiel de $-2,3$ V vs. ECS. Nous avons effectivement observé la disparition de la vague anodique du dimère au cours du temps.

2 Réduction électrochimique des modèles d'adduits (6-4)

Les oxétanes modèles **1**, **2**, **3** et **4** étudiés en réduction sont les mêmes que ceux étudiés en oxydation (voir schéma 3, page 22).

2-1 Réduction des oxétanes sans acide

Les 4 oxétanes modèles étudiés ont le même comportement à une électrode. Les voltamogrammes présentent une seule vague irréversible et très négative (autour de $-2,4$ V vs. ECS à $0,1$ V s⁻¹ pour les quatre modèles), dont le potentiel varie avec la vitesse de balayage avec une pente de l'ordre de -45 mV par décade et dépend légèrement de la concentration en substrat. Pour les quatre oxétanes modèles l'allure de la vague est particulière : sa largeur à mi-hauteur ne dépasse pas 35 mV à $0,1$ V s⁻¹ et son sommet n'est pas arrondi, mais pointu (figure 22, cas de l'oxétane **1**).

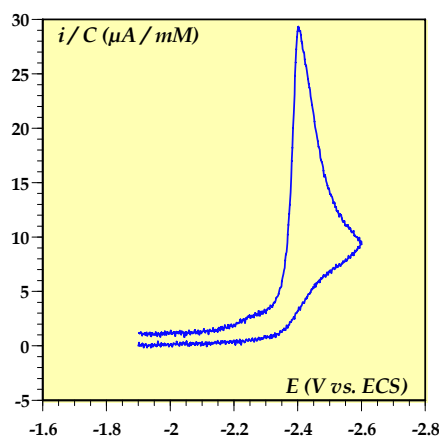


Figure 22. Réduction de l'oxétane **1** sur une électrode de carbone vitreux dans DMF.
 $C = 2,18$ mM, $v = 0,1$ V s⁻¹.

Cette forme de vague suggère que le mécanisme étudié implique la consommation de protons, ici en quantité insuffisante pour que toutes les molécules de substrat soient réduites à l'électrode, ce qui fait que la vague semble "coupée".

La stœchiométrie électronique a été mesurée selon la même méthode qu'en oxydation, c'est-à-dire par comparaison avec la vague d'oxydation monoélectronique de la benzoquinone dans le même solvant (ici, le DMF) en utilisant l'équation (6) pour l'oxétane **1**, et l'équation (5) pour les oxétanes **2**, **3** et **4**. La réduction de l'oxétane **1** est biélectronique ($n_{\text{calculé}} = 2,32$) tandis que la réduction des oxétanes **2** – **4** est monoélectronique ($n_{\text{calculé}} = 1,25$, $1,31$ et $1,09$ pour **2**, **3** et **4** respectivement).

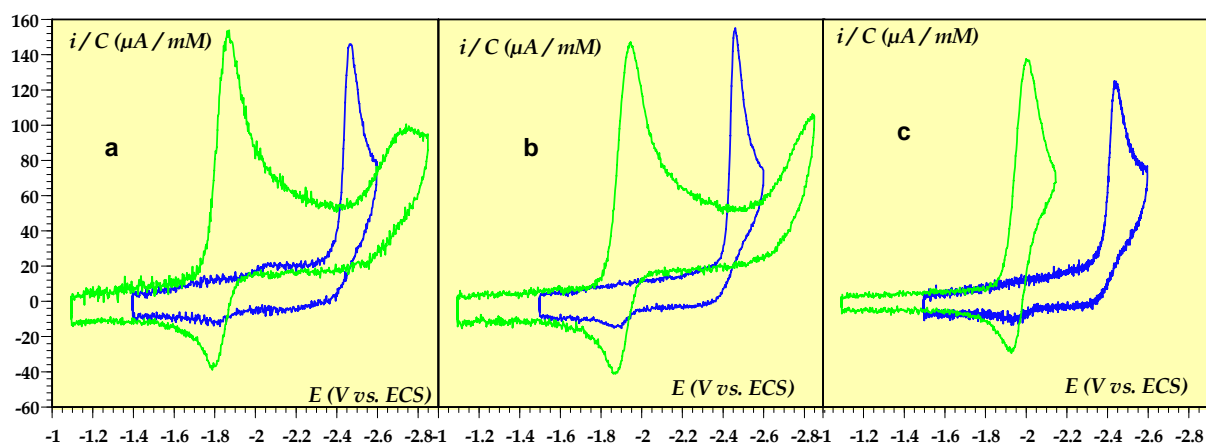


Figure 23. Réduction des oxétanes 2, 3 et 4 (en bleu) et de leur précurseur (en vert) à une électrode de carbone vitreux dans DMF.

a: oxétane 2 (1,23 mM) et benzaldéhyde (1,57 mM); b: oxétane 3 (1,49 mM) et p-méthylbenzaldéhyde (1,70 mM); c: oxétane 4 (1,39 mM) et p-méthoxybenzaldéhyde (1,97 mM). $\nu = 3 \text{ V s}^{-1}$.

Avec les oxétanes **2** à **4**, l'augmentation de la vitesse de balayage, à quelques volts par seconde, fait apparaître un signal d'oxydation de faible amplitude au retour, qui correspond à l'oxydation du radical anion de l'aldéhyde précurseur de chacun de ces composés (figure 23). Cela montre que la réduction de ces modèles à une électrode de carbone vitreux provoque bien la coupure du cycle à quatre atomes, avec formation de la base diméthylthymine neutre et du radical anion de l'aldéhyde. Cette vague retour n'est pas observée avec l'oxétane **1** car le radical anion de la benzophénone est réduit irréversiblement en dianion plus facilement que l'oxétane **1**.

2-2 Réduction des oxétanes en présence d'acide

Pour aller plus loin dans l'étude du mécanisme de réduction des oxétanes, nous avons rajouté de l'acide éthanoïque ou du 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE) dans le milieu réactionnel. Les oxétanes **1** à **3** ont été étudiés en présence de TFE, l'oxétane **4** avec de l'acide éthanoïque.

En présence de 4 équivalents de TFE, l'oxétane **1** est réduit suivant une seule vague irréversible (figure 24). Son potentiel de pic se situe à $-2,40$ V vs. ECS à $0,1$ V s⁻¹, et se déplace de -51 mV par décade de $\log v$. La vague est large de 50 mV à 1 V s⁻¹, et ne se déplace pas avec la concentration du substrat. La stœchiométrie électronique, calculée par application de l'équation (6), montre que le mécanisme de réduction de **1** implique l'échange de 3 électrons ($n_{\text{calculé}} = 2,9$).

Le voltamogramme de la réduction de l'oxétane **2**, avec 4 équivalents de TFE (figure 24), présente lui aussi une vague unique, irréversible, très négative ($-2,41$ V vs. ECS à $0,1$ V s⁻¹) et fine (55 mV à 1 V s⁻¹). Cette vague se déplace avec la vitesse de balayage, à raison de -48 mV par décade de \log , et ne se déplace pas avec la concentration. L'application de l'équation (5) permet de calculer que la réduction de **2** implique entre 2 et 3 électrons ($n_{\text{calculé}} = 2,5$). De même, l'oxétane **3**, en présence de 4 équivalents de TFE, est réduit suivant une seule vague irréversible, comme le montre la figure 24. Cette vague se situe à un potentiel de $-2,41$ V vs. ECS à $0,1$ V s⁻¹ et est large de 55 mV à 1 V s⁻¹. $\partial E_p / \partial \log v = -52$ mV par décade, et $\partial E_p / \partial \log C = 0$ mV. La réduction implique l'échange d'un peu plus de 2 électrons ($n_{\text{calculé}} = 2,5$).

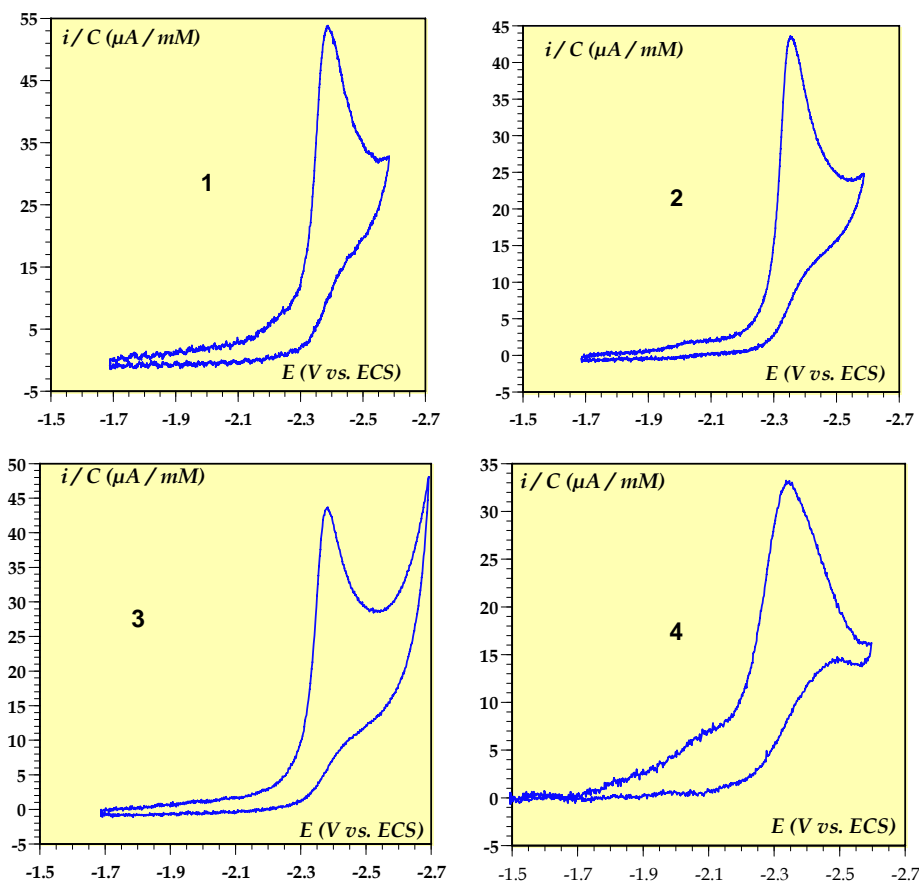


Figure 24. Réduction des oxétanes **1** à **4** en présence d'acide sur une électrode de carbone vitreux dans DMF. **1**: oxétane **1** ($0,98$ mM) + 4 éq de TFE; **2**: oxétane **2** ($2,91$ mM) + 4 éq de TFE; **3**: oxétane **3** ($1,20$ mM) + 4 éq de TFE; **4**: oxétane **4** ($1,39$ mM) + 1 éq de CH_3COOH . $v = 0,1$ V s⁻¹.

Concernant la réduction de l'oxétane **4** en présence d'un équivalent d'acide acétique, le voltamogramme présente une seule vague, qui se situe à $-2,34$ V vs. ECS à $0,1$ V s⁻¹ (figure 24) et se déplace linéairement avec la vitesse de balayage (-96 mV par décade). Sa largeur est de 91 mV à 1 V s⁻¹, la stœchiométrie électronique de la vague s'élève à 2 électrons par molécule ($n_{\text{calculé}} = 1,7$). L'acide acétique altère la ligne de base, si bien qu'il est difficile de mesurer précisément le courant de pic et la largeur des vagues, même si on soustrait le courant de base dû à l'acide seul dans le solvant.

2-3 Réduction du thiétane

Le voltamogramme du thiétane en réduction est présenté figure 25. Il montre deux vagues très proches, la première étant mélangée à la montée de la seconde. On ne peut donc pas analyser avec précision cette première vague. Les courants mesurés (inférieurs à 10 $\mu\text{A} / \text{mM}$) sont très faibles comparés à ceux mesurés habituellement (de l'ordre de 20 $\mu\text{A} / \text{mM}$ pour un transfert monoélectronique dans le DMF). On ne peut pas évaluer la largeur de la vague à mi-hauteur, il est donc difficile d'évaluer le nombre d'électrons impliqués dans cette réduction.

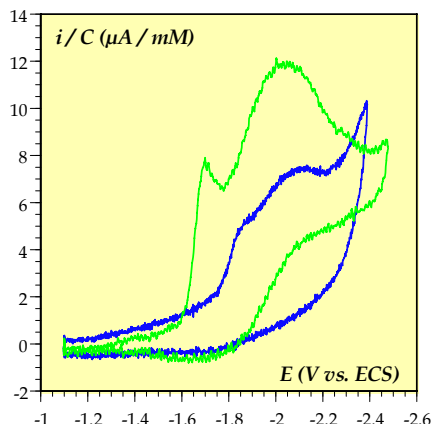


Figure 25. Réduction du thiétane et d'un mélange de thymine et de 4-thiouracile sur une électrode de carbone vitreux dans DMF. Bleu: thiétane ($1,67$ mM); vert: thymine ($1,87$ mM) + thiouracile ($1,73$ mM). $\nu = 0,1$ V s⁻¹.

La deuxième vague ne correspond pas à la réduction de la thymine, ni à celle du 4-thiouracile (dont la structure est proche du produit qui serait issu de la coupure du substrat de départ). Nous avons alors vérifié l'allure des vagues de réduction d'un mélange de ces deux composés dans la même solution. Les voltammogrammes obtenus (figure 25) montrent deux vagues distinctes. La première correspond à la réduction du 4-thiouracile, la deuxième est similaire en potentiel et en allure à la deuxième vague du thiétane. Il est donc très probable que l'injection d'un électron dans le thiétane conduit à sa coupure, avec formation du radical anion du 4-

thiouracile et d'une thymine neutre. Malgré les difficultés d'interprétation, il semble donc y avoir une forte analogie avec le mécanisme de réduction des oxétanes, confirmant la pertinence du choix de ce thiétane comme mime possible de la forme fermée des lésions (6-4) de l'ADN.

3 Description des mécanismes

3-1 Réduction des cyclobutanes

3.1.1) Mécanisme de réduction

Les données obtenues par voltamétrie cyclique sont rassemblées dans le tableau 4. De même qu'en oxydation, les six composés modèles étudiés ici ont un comportement très similaire à l'électrode, ce qui indique qu'ils suivent probablement le même mécanisme de réduction. Les dimères de configuration *syn* sont plus facilement réduits que ceux de configuration *anti*.

Tableau 4. Données voltamétriques pour la réduction des cyclobutanes (à 295 K).

composé	E_p^a	ΔE^b	$\partial E_p / \partial \log v^c$	n^d
<i>c,s</i> -DMU \diamond DMU	-2,34	45	-42	1,85
<i>c,s</i> -DMT \diamond DMT	-2,45	80	-62	1,75
<i>t,s</i> -DMU \diamond DMU	-2,34	42	-34	1,50
<i>c,a</i> -DMU \diamond DMU	-2,58	80	-50	1,85
<i>c,a</i> -DMT \diamond DMT	-2,61	80	-50	2,00
<i>c,a</i> -DMU ^{6Me} \diamond DMU ^{6Me}	-2,52	51	-39	1,95

a: en V vs. ECS, à 0,1 V s⁻¹. b: largeur de vague à mi-hauteur ($E_{p/2} - E_p$) à 0,1 V s⁻¹. c: en mV / décade. d: stœchiométrie électronique.

Comme en oxydation, les cyclobutanes étudiés sont réduits suivant un mécanisme similaire. Prenons l'exemple du *cis,syn*-DMU \diamond DMU. La largeur des vagues obtenues, ainsi que leur déplacement avec la vitesse de balayage indiquent que la réduction se fait suivant un mécanisme *E + C* séquentiel, dans lequel transfert d'électron et rupture de liaison se font en deux étapes distinctes. Un mécanisme concerté impliquerait le passage d'une barrière

d'activation ΔG^\ddagger plus grande à cause de la liaison à rompre (voir la discussion au chapitre 1 pour l'oxydation et l'annexe 3). Si tel était le cas, le transfert d'électron serait ralenti, et aurait lieu à un potentiel beaucoup plus négatif que le potentiel standard de la réaction. Cela mènerait à l'obtention de vagues ayant une largeur trois à quatre fois supérieure à celles que nous obtenons à faible vitesse de balayage. Suite à la réduction du dimère, vraisemblablement au niveau de la fonction cétone portée par le carbone C(4) adjacent au cycle à quatre atomes, la liaison C(5)–C(5') se coupe homolytiquement. La liaison C(6)–C(6') subit à son tour une rupture homolytique. Ces deux coupures aboutissent à la formation d'une monobase DMU neutre et d'une monobase radicalaire anionique. Nous avons montré que le DMU neutre est réduit au même potentiel que le *c,s*-DMU \rightleftharpoons DMU, suivant un mécanisme monoélectronique (voir annexe 2). La même étude a permis de démontrer que le radical anion ainsi obtenu dimérise, vraisemblablement en position C(6)/C(6'). Le mécanisme complet de réduction du dimère est illustré sur le schéma 21. Les résultats de la voltamétrie cyclique du *t,s*-DMU \rightleftharpoons DMU sont très similaires à ceux du *c,s*-DMU \rightleftharpoons DMU, notamment en terme de largeur de vague, de déplacement du potentiel avec v et de stœchiométrie électronique. La réduction du *t,s*-DMU \rightleftharpoons DMU suit également un mécanisme *E* + *C* séquentiel, transfert d'électron et rupture de liaison ne sont pas concertés. Ce substrat suit aussi le mécanisme proposé sur le schéma 21.

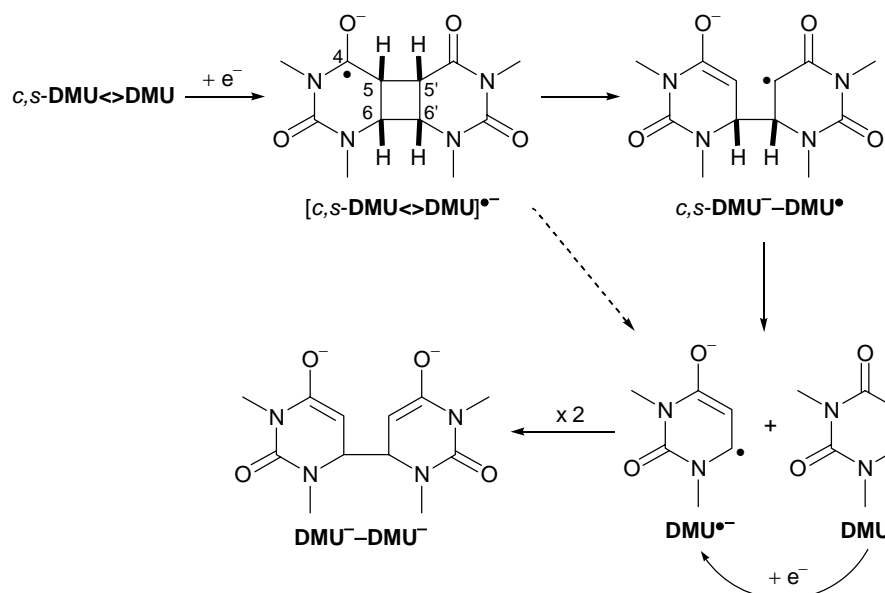


Schéma 21. Mécanisme de réduction électrochimique des cyclobutanes modèles.

La vague de réduction du *c,s*-DMT \rightleftharpoons DMT est plus large que celle du *c,s*-DMU \rightleftharpoons DMU (80 mV à 0,1 V s $^{-1}$ contre 45 mV), et se déplace plus vite avec la vitesse de

balayage. Néanmoins ces valeurs indiquent que le c,s -DMT \rightleftharpoons DMT est lui aussi réduit selon un mécanisme $E + C$ séquentiel, avec un transfert électronique suivi dans une seconde étape distincte, d'une réaction chimique irréversible. Le mécanisme du schéma 21 s'applique également à ce dimère.

Les dimères de configuration *anti*, c,a -DMU \rightleftharpoons DMU, c,a -DMT \rightleftharpoons DMT, et c,a -DMU^{6Me} \rightleftharpoons DMU^{6Me} sont réduits à des potentiels plus négatifs que les cyclobutanes de configuration *syn*, mais en terme de largeur des vagues, de déplacement du potentiel de pic avec la vitesse de balayage et de stœchiométrie électronique, les résultats de la voltamétrie cyclique sont à nouveau proches de ceux obtenus avec le c,s -DMU \rightleftharpoons DMU et le t,s -DMU \rightleftharpoons DMU d'un part (c'est le cas du c,a -DMU \rightleftharpoons DMU et du c,a -DMT \rightleftharpoons DMT), et avec le c,s -DMT \rightleftharpoons DMT d'autre part (c'est le cas pour c,a -DMU^{6Me} \rightleftharpoons DMU^{6Me}).

Le potentiel de pic des vagues cathodiques des cyclobutanes se déplace légèrement avec la concentration en substrat, ce qui indique l'interférence d'une réaction chimique de second ordre dans la cinétique de la réduction. L'étude de la réduction électrochimique des monobases (annexe 2) montre que les radicaux anions du DMU et du DMT dimérisent. Il semble que cette dimérisation participe au contrôle cinétique de la réduction du dimère. La rupture des deux liaisons C(5)–C(5') et C(6)–C(6') pourrait donc être très rapide devant la réduction de la monobase neutre formée et la dimérisation des deux radicaux anioniques produits. Toutefois, aucun fait expérimental ne permet de trancher sur l'éventuelle simultanéité des deux coupures de liaison C–C, comme le suggère la flèche en pointillés (schéma 21).

3.1.2) Estimation des potentiels standard

Les vagues irréversibles observées lors de la réduction des cyclobutanes sont situées à des potentiels très négatifs à faible vitesse de balayage. L'augmentation de la vitesse de balayage à quelques centaines de volts par seconde fait que la vague se confond avec le mur du solvant, empêchant l'observation d'une vague retour. Par contre pour les deux dimères de DMT, et avec c,a -DMU \rightleftharpoons DMU, le fait d'augmenter la vitesse de balayage à quelques volts par seconde permet de se placer dans des conditions où la cinétique de la réduction est uniquement contrôlée par le transfert de charge, ce qui se traduit sur les vagues par une largeur à mi-hauteur de l'ordre de 90 mV et par un déplacement du potentiel de pic de l'ordre de – 60 mV par décade de $\log \nu$ (α proche de 0,5). Dans ces conditions on peut relier, comme

nous l'avons fait en oxydation, le potentiel de pic au potentiel standard du dimère, dans une relation qui ne fait pas intervenir la constante de vitesse de coupure de liaison k_c :¹⁰

$$E_p = E_{\text{dimère/dimère}^{\bullet-}}^0 - 0,78 \frac{RT}{\alpha F} + \frac{RT}{\alpha F} \ln \left\{ k_s^{\text{app}} \left(\frac{RT}{\alpha F v D} \right)^{1/2} \right\} \quad (11)$$

où α est le coefficient de transfert, D le coefficient de diffusion de la molécule, estimé à $6,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ dans le DMF grâce à la relation de Stokes-Einstein, et k_s^{app} la constante de vitesse apparente de transfert de charge. Il est nécessaire d'évaluer k_s^{app} . On utilise pour ce faire et comme en oxydation une relation de type Marcus, dans laquelle l'enthalpie libre d'activation ΔG^\ddagger dépend de façon quadratique de l'enthalpie libre standard ΔG^0 .¹¹ En effet, cette relation s'applique bien aux transferts de type sphère externe. Pour une réduction :

$$k = Z e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad \text{et} \quad \Delta G^\ddagger = \Delta G_0^\ddagger \left(1 + \frac{\Delta G^0}{4 \Delta G_0^\ddagger} \right)^2$$

Avec $\Delta G^0 = F(E - E^0 - \Phi_2)$, où E est le potentiel de l'électrode, E^0 le potentiel standard de la réaction, c'est-à-dire le potentiel standard du couple dimère / dimère $^{\bullet-}$, et Φ_2 le potentiel au plan externe de Helmholtz. La barrière d'activation intrinsèque vaut $\Delta G_0^\ddagger \approx \lambda_0 / 4$, où λ_0 est l'énergie de réorganisation du solvant autour du dimère due au transfert électronique. Dans le même cadre d'approximations qu'au premier chapitre (force motrice de réduction faible) on peut linéariser ΔG^\ddagger et il vient :

$$k = Z e^{-\lambda_0 / 4 RT} e^{(F/2RT)\Phi_2} e^{-(F/2RT)(E-E^0)} = k_s^{\text{app}} e^{-(F/2RT)(E-E^0)}$$

Avec

$$k_s^{\text{app}} = Z e^{(-\lambda_0 / 4 RT)} e^{(F/2RT)\Phi_2} \quad (12)$$

Le facteur préexponentiel $Z (= \sqrt{RT / 2\pi M})$ est le facteur de collision hétérogène. Avec les cyclobutanes modèles, $\lambda_0 \approx 0,55 \text{ eV}$. Pour les potentiels d'électrode mis en jeu, Φ_2 vaut entre $-0,2$ et $-0,25 \text{ V}$.¹² L'application de l'équation (12) conduit à $k_s^{\text{app}} = 0,20 \pm 0,10 \text{ cm s}^{-1}$.

Cette valeur est utilisée pour calculer les potentiels standard via l'application de l'équation (11). On effectue ce calcul à une vitesse de balayage suffisamment élevée pour que la cinétique soit contrôlée que par le transfert de charge (typiquement 1 V s^{-1}). Les potentiels standard sont rassemblés dans le tableau 5. Ils sont assez proches des potentiels de pic mesurés, ce qui justifie a posteriori l'utilisation de l'équation (12).

Tableau 5. Estimation des potentiels standard pour la réduction des dimères d'uracile et de thymine.

Composé	$E^0_{\text{dimère/dimère}^{\bullet-}}$ (V vs. ECS)
<i>c,s</i> -DMT \rightleftharpoons DMT	$-2,665 \pm 0,025$
<i>c,a</i> -DMU \rightleftharpoons DMU	$-2,775 \pm 0,025$
<i>c,a</i> -DMT \rightleftharpoons DMT	$-2,805 \pm 0,025$

3.1.3) Influence de la configuration du cycle

Les valeurs des potentiels standard de formation du radical anion des cyclobutanes permettent de voir que la configuration *syn* ou *anti* a une incidence sur la réduction de ces composés. Pour le dimère de DMT, le potentiel standard du dimère de configuration *cis,anti* est plus négatif de 150 mV que celui de son homologue de configuration *cis,syn*. Ces résultats sont en accord avec ceux de Carell, qui a observé, dans ses conditions expérimentales, que la réparation par réduction de cyclobutanes modèles ne se fait pas pour la configuration *trans,anti*.^{7a} Nous avons fait des calculs quantiques (niveau B3LYP) sur les orbitales LUMO du *trans,syn*-DMU \rightleftharpoons DMU et du *trans,anti*-DMU \rightleftharpoons DMU. Ces calculs suggèrent l'existence d'interactions "through space" dans le dimère de configuration *syn*, ces interactions ayant pour effet d'abaisser l'énergie de l'orbitales.

Falvey, qui a étudié la réduction des dimères DMT par transfert d'électron photoinduit, a mis en évidence une influence de la configuration *cis* ou *trans* sur le potentiel de réduction des dimères de type cyclobutane. Dans ses conditions expérimentales, le *t,s*-DMT \rightleftharpoons DMT est beaucoup plus facile à réduire que le *c,s*-DMT \rightleftharpoons DMT.⁶ Cela a été interprété par le fait que dans le radical anion du cyclobutane *cis*, la fonction cétone réduite est à proximité d'une autre fonction cétone, ce qui se traduirait par des interactions charge-dipôle défavorables. Ces interactions seraient négligeables dans les dimère de configuration *trans* (schéma 22).

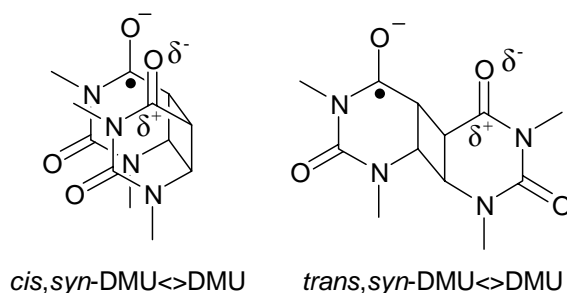


Schéma 22. Radicaux anions des dimères de *N,N'*-diméthyluracile de configurations *cis* et *trans*.

L'étude par voltamétrie cyclique des isomères *cis* et *trans* du DMU \rightleftharpoons DMU ne semble pas mettre en lumière de tels effets car les deux dimères sont réduits exactement au même potentiel ($-2,34$ V vs. ECS à $0,1$ V s $^{-1}$), et leurs vagues cathodiques possèdent la même largeur à mi-hauteur et le même déplacement avec $\log v$, en d'autres termes les caractéristiques cinétiques et thermodynamiques (E^0) de la réduction sont voisines.

3.1.4) Calculs sur des molécules modèles simplifiées

Le mécanisme de réduction du dimère d'uracile *c,s*-U \rightleftharpoons U a d'abord été modélisé par des calculs semi-empirique (AM1).¹³ La coupure des liaisons C(5)–C(5') et C(6)–C(6') se fait en passant une barrière d'activation assez faible (0,17 et 0,25 eV respectivement). La prise en compte de molécules de solvant (hexane et DMF) aboutit à un accroissement des barrières à franchir. Voityuk et Rösch ont ensuite procédé à des calculs *ab initio* sur la réduction du dimère d'uracile *c,s*-U \rightleftharpoons U aux niveaux HF et MP2.¹⁴ Si les calculs au niveau HF donnent des résultats similaires à ceux obtenus au niveau AM1, les modélisations MP2 prédisent que seule la coupure de la deuxième liaison est dotée d'une barrière, la rupture du cycle à quatre atomes étant endothermique d'environ 0,25 eV. Au niveau B3LYP, les mêmes résultats qu'au niveau MP2 sont obtenus en phase gazeuse. La prise en compte de molécules d'eau, qui forment une liaison hydrogène avec la fonction carbonyle portée par les carbones C(4) et C(4'), aboutit à des résultats différents. En raison de ces liaisons hydrogène, une barrière caractérise la coupure de la liaison C(5)–C(5') (0,05 eV), celle associée à la coupure de la liaison C(6)–C(6') devient nulle, les deux coupures sont donc simultanées.

Présentation des calculs

La réduction des cyclobutanes a été modélisée par des calculs quantiques sur le radical anion **D** $^{\bullet-}$, dont la structure est donnée figure 26. De même qu'en oxydation, il a été très difficile d'obtenir des structures réduites stables des dimères étudiés, en particulier pour les dimères de pyrimidine, ce qui nous a conduit à travailler sur des molécules modèles plus petites, dont les principales caractéristiques structurales (site supposé de la réduction) et géométrique (motif cyclobutane perpendiculaire au plan de l'uracile) restent proches de celles des cyclobutanes.

Résultats

A la géométrie d'équilibre du radical anion (état **1**, figure 26), la majorité du spin électronique (52 %) est localisée sur la fonction cétone C(4)–O(4), ce qui confirme l'idée

selon laquelle l'électron est injecté dans l'orbitale π^* de cette fonction. Un premier état de transition **TS1** a été identifié connectant d'une part au radical anion, d'autre part au radical anion dans lequel seule la liaison C(5)–C(5') est rompue (état **2**). La principale déformation géométrique à l'état de transition est la longueur de la liaison C(5)–C(5'), qui s'est allongée de 1,569 à 1,937 Å. Simultanément, la densité de spin sur le carbone C(5') augmente de 5 à presque 40 %, alors que celle en C(4) chute à 29 %. Il se produit donc un transfert d'électron intramoléculaire vers l'orbitale σ^* de la liaison C(5)–C(5') en même temps que cette liaison se coupe homolytiquement. Ce transfert d'électron intramoléculaire est rendu possible par le mélange des deux orbitales impliquées (liaison C–C perpendiculaire au plan contenant l'azote). L'enthalpie libre d'activation ΔG^\ddagger , calculée comme la différence d'enthalpie entre la géométrie d'équilibre et l'état de transition, est de 0,27 eV. Le passage de cette barrière mène à un deuxième minimum d'énergie potentielle. Cet état **2** correspond à la géométrie d'équilibre d'un radical anion où la liaison C(5)–C(5') est rompue. Pour cette géométrie d'équilibre, 97 % de la densité de spin électronique est localisée sur le carbone C(5'). Un deuxième état de transition **TS2** a été identifié qui relie le radical anion à l'état **2** d'une part, et les fragments coupés d'autre part (uracile et énamine). Pour ce nouvel état de transition, la liaison C(6)–C(6') s'est étirée de 1,585 à 2,049 Å, en route vers une coupure homolytique. Simultanément à cette coupure, la densité de spin en C(5') décroît de 97 à 58 %, au profit d'une densité en C(6), qui passe de 1 à 19 %. Cette seconde coupure homolytique est accompagnée d'un transfert d'électron intramoléculaire vers l'orbitale σ^* de la liaison C(6)–C(6'). L'enthalpie libre de cette deuxième coupure est plus petite que la première, elle vaut 0,11 eV.

La prise en compte de molécules de solvant via une méthode de solvation de type continuum électrique (COSMO, ACN) modifie un peu les valeurs des barrières, qui augmentent à 0,32 et 0,25 eV pour la coupure des liaisons C(5)–C(5') et C(6)–C(6') respectivement. Cette augmentation est due à la stabilisation des structures des intermédiaires réactionnels.

Le modèle de coupure homolytique des ions radicaux, présenté au premier chapitre, s'applique également pour la coupure réductive des cyclobutanes étudiée ici. Le transfert d'électron intramoléculaire qui accompagne la rupture homolytique des deux liaisons C–C occasionne une réorganisation nucléaire λ_i , ainsi qu'une réorganisation du solvant λ_0 due au changement de répartition de la densité de charge entre l'intermédiaire et les fragments coupés.

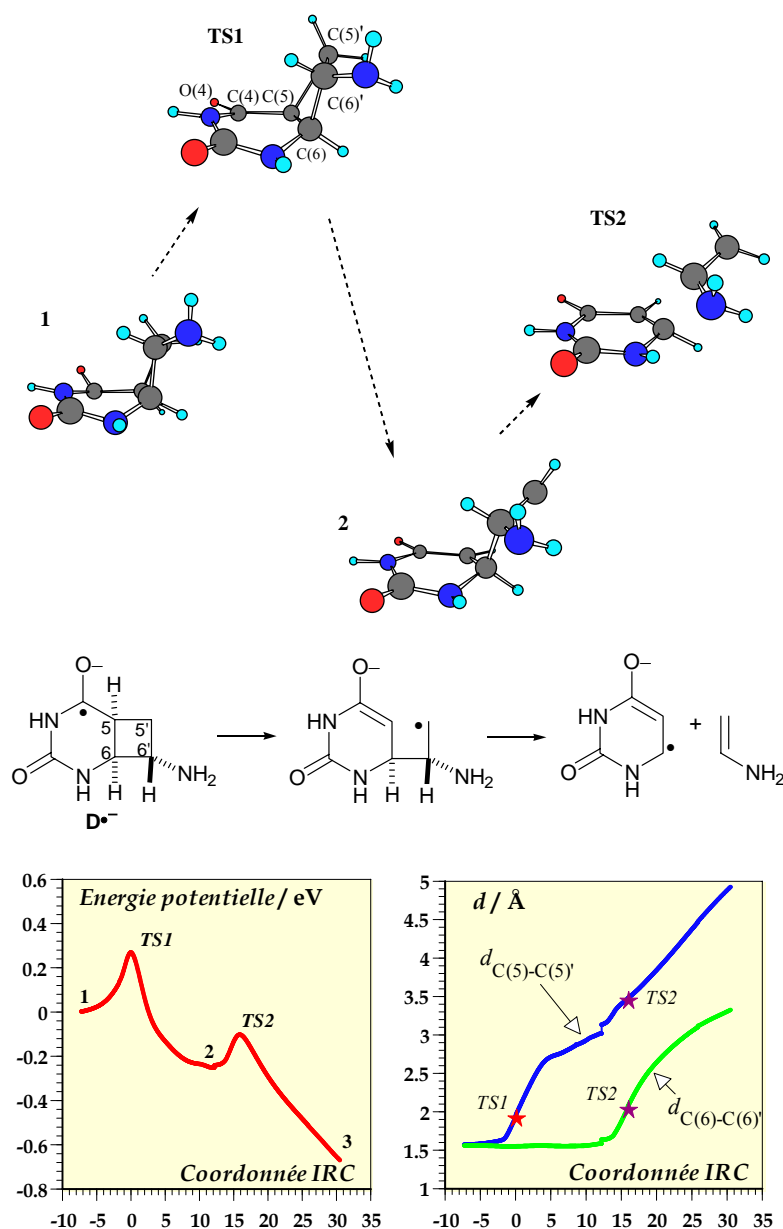


Figure 26. Réduction en phase gazeuse de $D^{\bullet-}$. Haut : structures aux minima d'énergie (1 et 2) et aux états de transition (TS1 et TS2). Bas : Energie potentielle (B3LYP/6-31G*) (gauche) et longueurs des liaisons C-C (droite) en fonction de la coordonnée pondérée IRC (coordonnée de réaction en $u^{-1/2} a_0$).

Atomes : gris, carbone ; rouge, oxygène ; bleu, azote ; bleu clair, hydrogène.

La barrière d'activation, exprimée ici sous la forme d'une énergie interne, est reliée de

façon quadratique à la force motrice mise en jeu : $\Delta U^\ddagger \cong \frac{\lambda_1 + \lambda_0}{4} \left(1 + \frac{\Delta U^0}{\lambda_1 + \lambda_0} \right)^2 (-H)$

avec $\lambda_1 = \frac{E_A^* + E_{AB}^*}{2}$. Nous avons évalué E_A^* (3,7 eV) et E_{AB}^* (2,0 eV) par calcul quantique

sur $D^{\bullet-}$ (E_{AB}^* : énergie d'excitation $\pi^* \rightarrow \sigma^*$ pour la structure 1; E_A^* énergie d'excitation anion \rightarrow anion radical pour la structure 2) soit $\Delta U_{\text{modèle}}^\ddagger \approx (0,7 - H)$ eV, à comparer aux 0,27 eV calculés au niveau B3LYP (figure 26).

3-2 Réduction des oxétanes

3.2.1) Mécanisme de réduction

Les données électrochimiques expérimentales sont détaillées dans le tableau 6. La largeur des vagues cathodiques ainsi que le déplacement du potentiel de pic avec la vitesse de balayage montre que le processus de réduction suit un mécanisme séquentiel, au cours duquel un transfert d'électron est suivi, dans une seconde étape distincte, d'une rupture de liaison. Lors de la réduction des oxétanes **2** à **4** sans acide, l'augmentation de la vitesse de balayage à quelques volts par seconde fait apparaître la vague d'oxydation retour du radical anion de l'aldéhyde aromatique précurseur de l'oxétane. Cette observation montre que la réduction des oxétanes à une électrode de carbone vitreux mène à la rupture du cycle à quatre atomes suivant un mécanisme de type rétro Paterno-Büchi, illustré sur le schéma 23.

Tableau 6. Résultats de la voltamétrie pour la réduction des oxétanes en présence d'acide.

Oxétane	E_p^a	ΔE^b	$\partial E_p / \partial \log v^c$	n^d
1	-2,40	50	-51	2,9
2	-2,41	55	-48	2,5
3	-2,41	55	-52	2,5
4	-2,34 ₅	90	-74	1,7

a: en V vs. ECS, à 0,1 V s⁻¹. b: largeur de vagues à mi-hauteur ($E_{p/2} - E_p$) à 1 V s⁻¹. c: en mV / décade. d: stœchiométrie électronique.

Suite à la réduction de la fonction cétone portée par le carbone C(4) de la DMT, la liaison C–O du motif oxétane se coupe hétérolytiquement. Cette coupure est suivie de la rupture homolytique de liaison C(6)–C(7). Les produits de cette double coupure sont la diméthylthymine neutre et le radical anion du carbonyle aromatique. La DMT est ensuite réduite, suivant un mécanisme monoélectronique, en son radical anion. Le radical anion du carbonyle aromatique diffuse pour partie en solution, où il dimérise en pinacol, et est pour une autre partie réduit à l'électrode, ce qui conduit à la formation d'un alcool. Quel que soit le devenir du radical anion du carbonyle, on voit sur le schéma 23 que le mécanisme nécessite la présence de deux protons par molécule de carbonyle, ce qui va dans le sens de l'explication donnée précédemment pour la forme des vagues de réduction des oxétanes sans acide. Suite à la coupure du cycle, le mécanisme suivi dépend de la nature du carbonyle aromatique impliqué dans la réduction. L'oxétane **1**, synthétisé avec la benzophénone, se réduit suivant un mécanisme à 3 électrons, ce qui suggère que le radical anion de la benzophénone est réduit en dianion à l'électrode, ce qui est cohérent avec le fait que la vague cathodique de l'oxétane

1 se situe à un potentiel plus négatif que celui de la deuxième vague de la benzophénone. Cela explique également que la vague d'oxydation retour du radical anion de la benzophénone ne soit jamais observée en augmentant la vitesse de balayage.

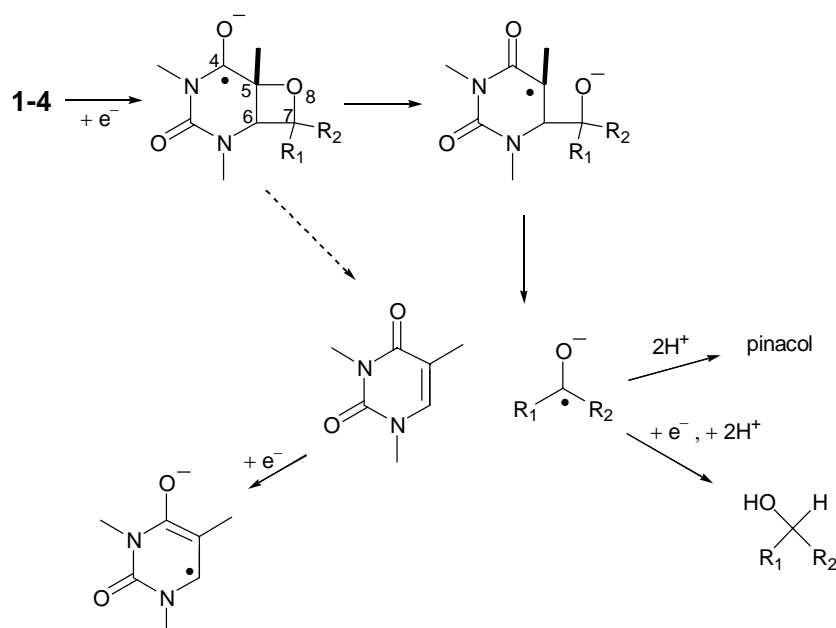


Schéma 23. Mécanisme de réduction des oxétanes 1-4.

Pour les oxétanes **2** à **4**, la stœchiométrie électronique de la vague cathodique est légèrement supérieure à deux électrons par molécule. Cela indique que la dimérisation du radical anion de l'aldéhyde aromatique est plus favorable, notamment parce que le carbone radicalaire est moins encombré que celui de la benzophénone. De plus, quand on passe du radical anion de la benzophénone à celui du benzaldéhyde, le remplacement d'un cycle benzénique par un proton renforce la charge négative présente sur l'oxygène (effet mésomère). L'oxygène devient plus basique, il va donc être protonné plus facilement, ce mécanisme entre en compétition avec la deuxième réduction du radical anion.

L'utilisation de la voltamétrie cyclique à haute vitesse de balayage n'a pas permis de détecter la réoxydation des radicaux anions des oxétanes.

3.2.2) Calculs quantiques

Peu de modélisations de la coupure du radical anion d'oxétanes modèles ont été faites. Des calculs menés aux niveaux semi-empiriques AM1 et PM3, sur un oxétane modèle issu de l'addition de deux thymines (schéma 24), indiquent que la coupure du motif oxétane suit un mécanisme séquentiel.¹⁵ La liaison C(5)–O se rompt en premier, en passant par une petite barrière d'activation (0,18 eV). Un état de transition a pu être identifié, dans lequel la charge

négative est localisée sur l'atome d'oxygène porté par le carbone C(4') tandis que le spin se situe sur le carbone C(5) (schéma 24). La liaison C(6)–C(4') se coupe dans un second temps, en passant par une seconde barrière d'activation, beaucoup plus faible que la première (0,01 eV).

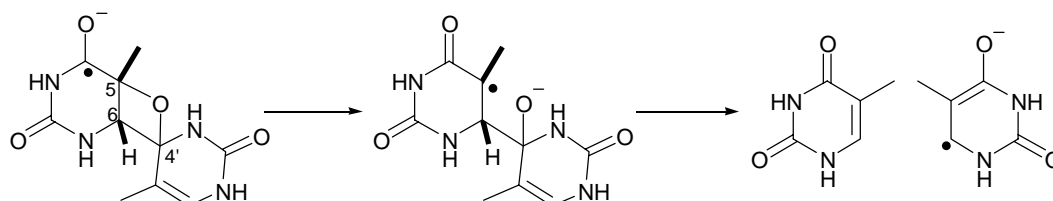


Schéma 24. Coupure du radical anion d'un oxétane modèle.

Le modèle simplifié $E^{\bullet-}$ a été choisi pour faire des calculs au niveau B3LYP (figure 27).

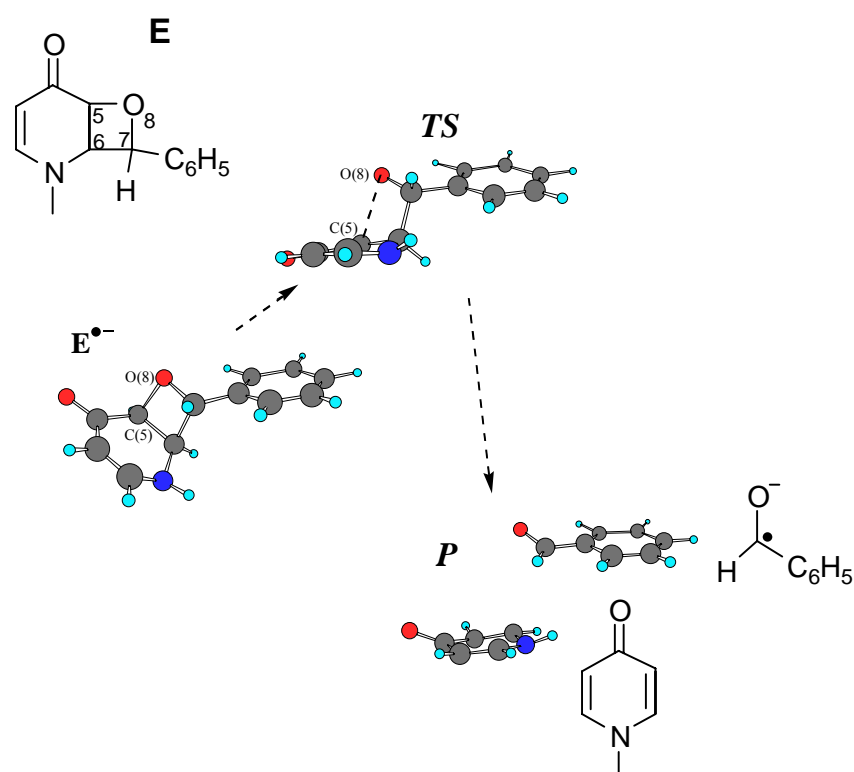


Figure 27. Réduction de E, modèle d'oxétane.

Atomes : gris, carbone ; rouge, oxygène ; bleu, azote ; bleu clair, hydrogène.

A la géométrie d'équilibre du radical anion $E^{\bullet-}$, la majorité du spin électronique est localisé sur l'hétérocycle. Un état de transition **TS** a été identifié connectant d'une part au radical anion, d'autre part aux fragments séparés. Cet état de transition correspond à la coupure hétérolytique de la liaison C(5)–O(8). La barrière à franchir est de l'ordre de 0,12 eV en phase gazeuse, la prise en compte d'un solvant par un calcul COSMO (dans ACN) abaisse l'énergie d'activation à 0,02 eV. Après cet état de transition, l'énergie continue de décroître jusqu'à la formation des produits issus de la réaction rétro Paterno-Büchi, sans passer par un autre

minimum d'énergie. Cela indique que la coupure homolytique de la liaison C(3)–C(4) se fait sans passer par un état de transition.

3-3 Réduction du thiétane

Les voltamogrammes obtenus montrent que la réduction du thiétane aboutit à sa rupture. La vague de réduction du 4-thiouracile en présence de thymine fournit un indice expérimental de la coupure du cycle suite à la réduction. Elle montre aussi que le 4-thiouracile est réduit bien avant la thymine et l'uracile, ce qui indique que la réduction du thiétane se fait sur la partie base thiolée. Le radical anion du 4-thiouracile réagirait ensuite avec la thymine neutre (une possibilité est l'addition nucléophile de ce radical anion sur la double liaison carbone – carbone de la thymine).

4 Pertinence des résultats de l'électrochimie dans le cadre de la réparation enzymatique ?

Nos études de la réduction des modèles de lésions par voltamétrie cyclique suggèrent un mécanisme séquentiel de réparation des cyclobutanes, ie. transfert d'électron et rupture de liaison se font en deux étapes distinctes. Le mécanisme de coupure des cyclobutanes s'applique à nos molécules, dans nos conditions expérimentales, distinctes à plusieurs égards des conditions biologiques de réparation enzymatique des dimères de thymine de type cyclobutane. Plusieurs facteurs peuvent en effet avoir une influence sur le type de processus suivi, comme le mode d'injection de l'électron, la structure des modèles que nous étudions, ou encore le milieu dans lequel la réaction a lieu. On peut donc se demander dans quelle mesure nos résultats sont transposables ou pas à la réparation enzymatique qui a lieu *in vivo* et dans quelle mesure les différents paramètres thermodynamiques et cinétiques obtenus pourraient aider à déterminer les mécanismes. Nous allons successivement discuter les différents facteurs qui peuvent contrôler et orienter le mécanisme.

4-1 Force motrice de la réaction de transfert de charge

Dans nos expériences, le transfert d'électron est déclenché à une électrode. Lors de la réparation enzymatique des dimères, il s'agit d'un transfert d'électron photoinduit. La principale différence entre les deux modes d'injection réside dans la force motrice ΔG^0 mise en jeu pour le transfert de charge. Un transfert d'électron photoinduit réductif se fait à partir d'un donneur à l'état excité. En conséquence, la force motrice est généralement plus importante que pour un transfert d'électron électrochimique. Par exemple, le potentiel d'électrode pour la réduction du dimère *c,s*-DMU \rightleftharpoons DMU est proche de $-2,35$ V vs. ECS tandis que le potentiel standard de la flavine FADH^- à l'état excité ($E^0(\text{FADH}^\bullet/\text{FADH}^{-*})$) vaut $-2,92$ V vs. ECS (voir le calcul détaillé de cette grandeur au paragraphe 4-4). Des études antérieures ont montré que la force motrice joue un rôle important dans le caractère séquentiel ou concerté du processus de transfert de charge couplé à une coupure de liaison. De façon générale, l'augmentation de la force motrice favorise la voie séquentielle (figure 28).¹⁶ Autrement dit, si un mécanisme séquentiel est observé en électrochimie, il sera également suivi lors d'un transfert d'électron photoinduit. Il est donc tentant, à ce niveau de la discussion, de conclure que la réduction enzymatique des dimères de thymine de type cyclobutane suit une voie séquentielle.

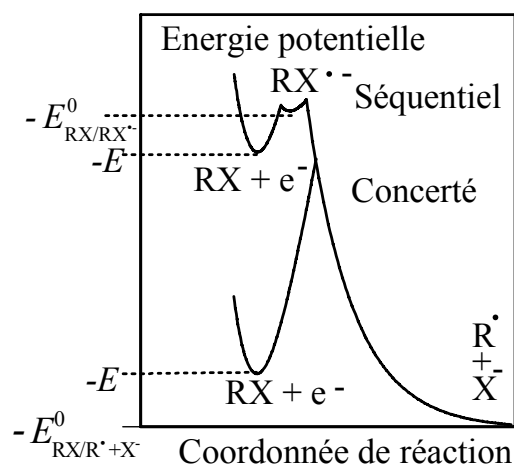
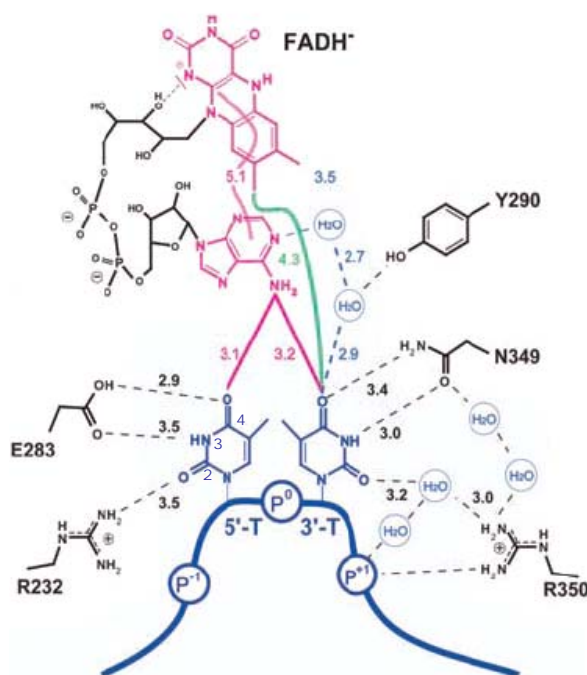


Figure 28. Diagramme d'énergie potentielle pour la coupure réductrice d'un substrat RX. Voies séquentielle et concertée.

4-2 Influence de l'environnement enzymatique

Le solvant dans lequel nous étudions la réduction de nos modèles offre un environnement assez éloigné de celui présent dans la poche catalytique de la photolyase.

Le second facteur important est la présence d'acides aminés à l'intérieur du site catalytique. La structure cristalline de la photolyase de *A. nidulans* liée à son substrat (réparé) montre que les deux bases restaurées interagissent avec des résidus présents au sein de la poche catalytique via des liaisons hydrogène (figure 29).¹⁷



Ces résidus servent à renforcer l'interaction de l'enzyme avec son substrat, et peuvent également faciliter le transfert d'électron lors de la réparation, par exemple en stabilisant un éventuel radical anion. On remarque en particulier la présence d'un acide glutamique (E283) qui, protonné, pourrait stabiliser le radical anion issu de la réduction du dimère par la flavine excitée. Cette hypothèse s'appuie sur une étude expérimentale de réparation enzymatique, suivie par électrophorèse, avec la photolyase ADN de *S. cerevisiae*. La mutation du résidu

acide glutamique par une alanine provoque une diminution de 60 % du rendement quantique de réparation.¹⁸

4-3 Structure du substrat

Les molécules choisies pour étudier la réparation des cyclobutanes sont des modèles simplifiés des lésions induites dans un brin d'ADN. Nos modèles ne comportent que les deux bases, thymine ou uracile méthylée, liées par un motif cyclobutane. Ces deux bases ne sont pas reliées par les deux pentoses qui font partie de la chaîne phosphatée de la double hélice. La substitution des hydrogènes portés par les azotes par des groupes méthyle a certainement peu d'incidence sur les paramètres thermodynamiques et cinétiques du processus, donc sur le mécanisme de coupure réductrice, notamment parce que les azotes ne sont pas directement impliqués dans cette réaction.

Considérons un dimère de type cyclobutane au sein du double brin d'ADN. La formation d'une lésion de ce type provoque la torsion du brin d'ADN d'un angle allant de 20 à 30° (figure 30).¹⁹ On peut penser que cette torsion provoque des contraintes au niveau du motif cyclobutane, étire et donc affaiblit les liaisons C(5)–C(5') et C(6)–C(6') (schéma 25, page 78). Quand l'enzyme s'accroche au brin d'ADN, l'angle de torsion croît jusqu'à 50° (figure 30).¹⁷ La photolyase positionne ensuite la lésion à l'entrée de sa poche catalytique, où le transfert d'électron a lieu. Il est donc possible que les liaisons C(5)–C(5') et C(6)–C(6') soient étirées de telle sorte que l'énergie de l'orbitale σ^* de la liaison C(5)–C(5') soit abaissée, et rende ainsi la voie concertée compétitive par rapport à la voie séquentielle. L'étirement des deux liaisons rompues lors de la reconnaissance de la lésion par l'enzyme ne peut pas être vérifiée de manière directe, car la structure cristalline d'une photolyase ADN liée à son substrat n'a pas encore été élucidée. Cependant, la structure de l'enzyme liée à son substrat réparé est connue depuis peu.¹⁷ Cette étude a permis d'observer la structure d'un site thymine-thymine dans le site catalytique de la photolyase ADN de *A. nidulans*, juste après la coupure du motif cyclobutane initial. La lésion était initialement insérée dans un oligonucléotide double brin, contenant 14 paires de bases. Il ressort de cette étude que la structure du site thymine – thymine endommagé n'est pas très déformée au cours de la réparation d'une lésion de type cyclobutane. La position des deux bases l'une par rapport à l'autre ne varie que par l'angle entre les deux plans des thymines, qui diminue de 56 à 16° lors de la coupure du cycle à quatre atomes. Les contraintes subies par la lésion dans un brin d'ADN seraient donc modestes, néanmoins l'énergie de l'orbitale la plus basse vacante est

sans doute un peu abaissée lors de la complexation enzyme-substrat, ce qui favorise la voie concertée.

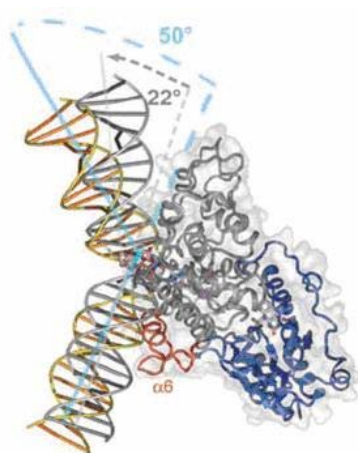


Figure 30. Structure d'un brin d'ADN contenant une lésion de type cyclobutane avant (gris) et après (jaune) accrochage avec l'enzyme (reproduit de la référence 17).

Une étude résolue en temps (picoseconde) du transfert de charge de la flavine excitée vers des lésions incluses dans des doubles brins d'ADN est venue récemment confirmer cette conclusion.²⁰ La réparation de plusieurs substrats contenant une lésion de type cyclobutane (T\diamondT) a été suivie par spectroscopie d'absorption pompe-sonde et fluorescence dans la gamme picoseconde. Les substrats étudiés sont des oligonucléotides de longueurs différentes, avec 2, 12 ou 18 bases et les vitesses de transfert d'électron ne sont pas dépendantes de la longueur du substrat, suggérant donc que le mécanisme de "flipping out" de la lésion (accrochage enzyme / lésion) n'a pas ou peu d'influence sur le motif cyclobutane. Dans une autre étude du complexe enzyme-substrat par spectroscopie UV à l'échelle subpicoseconde, Stanley et al. ont suggéré que la barrière d'activation liée à la coupure de la liaison C(5)–C(5') est très faible, voire nulle. La reformation des deux thymines ne se ferait pas immédiatement après le transfert électronique. La coupure de la liaison C(6)–C(6') serait donc cinétiquement déterminante. Le mécanisme passerait par un radical anion, mais dont le motif cyclobutane serait ouvert (**C**, schéma 25). Cette hypothèse est en contradiction avec les conclusions de Sancar, qui propose que le cycle de réparation de l'ADN par la photolyase passe par le radical anion du dimère "fermé" (**B**, schéma 25).

Émergent à ce niveau de la discussion deux chemins possibles (schéma 25) : le premier implique le passage par un radical anion "fermé" (**B**), suivi d'une coupure rapide de la liaison C(5)–C(5'), elle-même suivie de la coupure sans barrière de la liaison C(6)–C(6'). C'est un chemin séquentiel, analogue à nos mécanismes électrochimiques. Le second implique un premier transfert d'électron dissociatif concerté avec la coupure de la liaison

C(5)–C(5'). Dans un second temps, le radical anion ouvert formé (C) se couperait de façon homolytique avec une barrière non nulle. Ce chemin peut être qualifié de concerté.

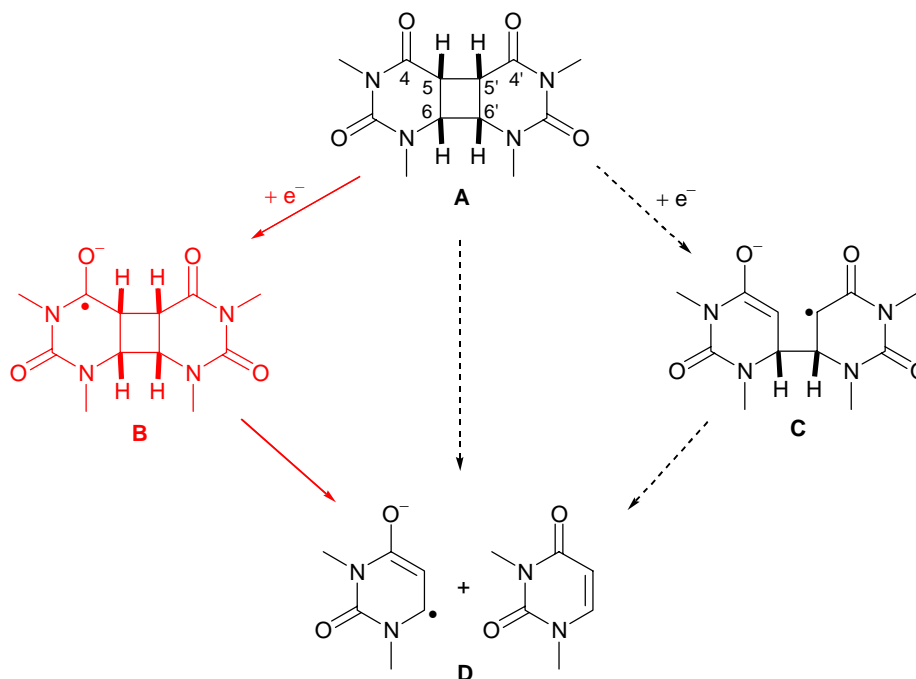


Schéma 25. Mécanismes possibles pour la réduction d'un cyclobutane lors de la réparation par la photolyase ADN. Rouge: mécanisme suivi en électrochimie.

Reprenons les données cinétiques du travail de Sancar, qui a mesuré une vitesse de 170 ps pour le transfert d'électron initial entre la lésion et FADH^{*-} .¹⁹ Nous avons choisi de nous appuyer sur cette étude car selon nous, il s'agit de l'étude cinétique la plus rigoureuse portant sur la réparation enzymatique des cyclobutanes. Les données sont mesurées directement lors de la réparation d'une lésion incluse dans un oligonucléotide par une photolyase ADN et ce système est un excellent mime de la réparation de l'ADN. La constante de vitesse du transfert d'électron de la flavine vers la lésion peut être évaluée par la formule semi-classique (transfert non adiabatique) :

$$k_{et} = \sqrt{\frac{4\pi^3}{h^2 \lambda RT}} H^2 e^{-\frac{(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4\lambda RT}} e^{-\beta(r-r_0)}$$

où λ est l'énergie de réorganisation, ΔG^0 la force motrice de la réaction, H l'énergie de couplage donneur/accepteur, β le facteur d'atténuation du transfert avec la distance donneur/accepteur et r la distance donneur/accepteur. Des calculs ont montré qu'une valeur raisonnable de H était 30 cm^{-1} ($3,7 \times 10^{-3} \text{ eV}$).²¹ On prendra dans la suite $\beta \approx 1 \text{ \AA}^{-1}$, et $r - r_0 \approx 1 \text{ \AA}$.

Pour la voie séquentielle, le facteur de réorganisation se résume à la contribution du solvant (λ_0) et peut être estimé à environ 0,8 eV. La force motrice mise en jeu vaut alors :

$$\Delta G^0 = E_{\text{FADH}^\bullet/\text{FADH}^-}^0 - E_{\text{dimère/dimère}^{\bullet-}}^0 \approx -E_{\text{FADH}^-}^* + E_{\text{FADH}^\bullet/\text{FADH}^-}^0 - E_{\text{dimère/dimère}^{\bullet-}}^0$$

$$\approx -2,76 - 0,16 + 2,55 = -0,37 \text{ eV}.$$

Dans cette expression, $E_{\text{FADH}^-}^*$ représente l'énergie de l'état excité du cofacteur FADH^- et les potentiels standard sont exprimés en eV.

$E_{\text{FADH}^\bullet/\text{FADH}^-}^0$ a été récemment déterminé avec précision par Schelvis et al.²² et $E_{\text{dimère/dimère}^{\bullet-}}^0$ est une estimation à partir de nos mesures électrochimiques sur le dimère *c,s*-DMT \rightleftharpoons DMT (voir paragraphe 3.1.2 de ce chapitre) auquel nous avons ajouté $\sim 0,1$ V pour tenir compte de la stabilisation par liaison hydrogène du radical anion dans le site catalytique. Nous trouvons alors $k_{et} = 10^{-10} \text{ s}^{-1}$, soit une vitesse de l'ordre de 100 ps pour le transfert de charge (250 ps si on ne tient pas compte de l'atténuation due à la séparation donneur/accepteur), très proche de la valeur expérimentale mesurée par Sancar.

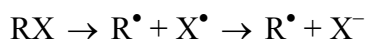
Pour la voie concertée, le calcul comporte plus d'inconnues. En effet le facteur de réorganisation contient la contribution du solvant et celle de la liaison rompue :

$$\lambda = \lambda_0 (\text{solvant}) + D (\text{énergie de dissociation homolytique de la liaison C(5)–C(5')})$$

$$\Delta G_{\text{diss}}^0 = E_{\text{FADH}^\bullet/\text{FADH}^-}^0 - E_{\text{dissociatif}}^0$$

$$\text{avec } E_{\text{dissociatif}}^0 = -D + T\Delta S (\text{entropie de coupure}) + E_{\text{groupe partant}}^0.$$

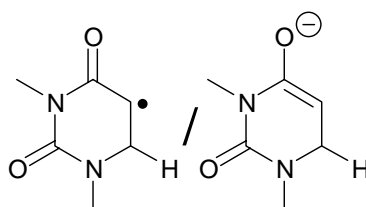
Cette dernière relation est obtenue en décomposant la réaction de coupure réductrice d'un composé RX en $\text{R}^\bullet + \text{X}^-$ comme la coupure homolytique de la liaison suivie de la réduction du groupe partant X^\bullet :



$$\text{ainsi } \Delta G^0 = -\Delta G_{\text{coupure}}^0 - \Delta G_{\text{réduction}}^0 = -(\Delta H_{\text{coupure}}^0 - T\Delta S_{\text{coupure}}^0) - \Delta G_{\text{réduction}}^0$$

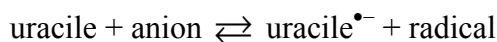
$$\text{soit } E_{\text{dissociatif}}^0 = -D + T\Delta S + E_{\text{groupe partant}}^0.$$

On prend $\lambda_0 \approx 0,8$ eV et $T\Delta S \approx 0,1$ eV. Le potentiel standard du groupe partant correspond au couple :



radical / anion

Son estimation peut être faite en calculant la variation d'enthalpie libre standard dans l'acétonitrile (B3LYP/6-31G*, COSMO) de la réaction :



$$\Delta G^0 = E_{\text{rad/anion}}^0 - E_{\text{uracile/uracile}^{\bullet-}}^0.$$

Le potentiel standard pour la réduction de l'uracile $E_{\text{uracile/uracile}^{\bullet-}}^0$ étant connu dans ce solvant ($-2,39$ V).²³

On obtient $E_{\text{rad/anion}}^0 = -0,255$ V vs. ECS, soit $\Delta G_{\text{diss}}^0 = -2,76 + D$. On cherche alors la valeur de D nécessaire à l'obtention d'une vitesse de transfert d'électron égale à 170 ps. On obtient $D = 1,48$ eV, une valeur qui semble trop faible malgré l'éventuelle tension de cycle induite lors de la complexation enzyme / substrat. Il faut néanmoins tenir compte du fait qu'au sein de la poche catalytique, les deux fragments issus de la coupure ne sont pas éloignés à l'infini l'un de l'autre, l'énergie à fournir pour rompre la liaison est donc moins importante que l'énergie de coupure homolytique de cette même liaison.

En conclusion, ces calculs, même s'ils comportent une série d'approximations, renforcent l'hypothèse d'un mécanisme séquentiel.

4-4 Rendements quantiques de réparation enzymatique

Cas des dimères de type cyclobutane

Le rendement quantique de réparation de ces lésions par la photolyase ADN est proche de l'unité ($\Phi = 0,9$). Le diagramme d'énergie potentielle de la réaction entre la flavine et un dimère de thymine de type cyclobutane peut apporter une explication (schéma 26). Le diagramme de droite représente la voie séquentielle.

L'absorption d'un photon par la flavine conduit à l'état **2**. Le transfert d'électron de la flavine vers le dimère mène à l'état **3** en passant par une barrière d'activation. L'état **3** représente le radical anion du dimère non coupé. La coupure d'une première liaison C-C passe par une deuxième barrière énergétique et forme le radical anion dont le cycle central est ouvert, représenté par l'état **4**. Les deux bases thymine issues de la coupure de **4** (rupture de la seconde liaison C-C) et l'oxydation rapide de la base radicalaire anionique ne sont pas montrées dans le diagramme. Une fois l'état **3** atteint, le transfert d'électron retour vers les réactifs (**1**) est très défavorable (région inverse), par conséquent le rendement quantique de réparation approche l'unité.²⁴

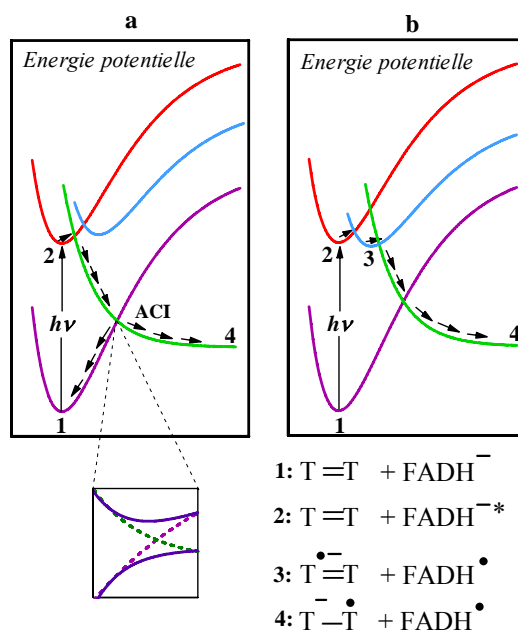


Schéma 26. Diagrammes d'énergie potentielle d'ordre zéro de la réaction redox de entre la flavine ($FADH^{-}$) et un dimère de thymine ($T=T$). Voies concertée (a) et séquentielle (b).

La voie concertée est représentée par le diagramme de gauche sur le schéma 26. L'agrandissement représente la zone de croisement évité (ACI) des courbes des réactifs et des produits (pointillés: courbes diabatiques, trait plein: courbes adiabatiques). Le mécanisme passe directement de l'état **2** à l'état **4**, sans passer par le radical anion **3**. Ce processus est très exergonique, la barrière intrinsèque est grande à cause de la contribution de la coupure de la liaison. Cette voie pourrait être néanmoins favorisée comme nous l'avons déjà noté par des contraintes physiques imposées sur le motif cyclobutane, qui diminueraient la barrière. Dans ce cas, le chemin réactionnel vers l'état **4** passe par une intersection entre la surface d'énergie potentielle des réactifs à l'état fondamental, et celle des produits de coupure de la liaison C(5)–C(5'). Le rendement quantique de ce processus serait donc gouverné par le fractionnement du système au niveau de la zone ACI. Un rendement quantique inférieur à 1 est tout à fait possible. Une valeur de 0,9 indique un croisement faiblement adiabatique.²⁴

Cas des adduits (6-4)

Le rendement quantique de réparation des adduits (6-4) par les photolyases (6-4) est de l'ordre de 0,11.^{25,26} Cette faible valeur est-elle le reflet d'un processus séquentiel ? Même si nous n'avons pas pu accéder aux potentiels standard de formation du radical anion des oxétanes, le caractère séquentiel de leur coupure en réduction indique que le potentiel standard est légèrement plus négatif que les potentiels de pic des vagues de voltamétrie. Ceux-ci se situent entre – 2,34 et – 2,41 V vs. ECS à faible vitesse de balayage, il est donc

raisonnable d'estimer E^0 autour de $-2,5$ V. Le même raisonnement qu'avec les cyclobutanes indique que formation de la paire ($\text{FADH}^\bullet / \text{oxétane}^{\bullet-}$) est exergonique ($\Delta G^0 = -0,42$ eV), et que le transfert d'électron retour vers le radical de la flavine se trouve dans la région inversée de Marcus ($\Delta G_{\text{retour}}^0 = E_{\text{oxétane/oxétane}^{\bullet-}}^0 - E_{\text{FADH}^\bullet/\text{FADH}^-}^0 \approx -2,34$ eV $\ll -\lambda \approx 1$ eV). Le transfert d'électron retour ne devrait pas entrer en compétition avec la coupure de la liaison C–O du motif oxétane. Le passage éventuel par le radical anion de l'oxétane ne suffit donc pas à justifier une si faible valeur de rendement de réparation enzymatique. Une explication possible est que le mécanisme de réparation proposé inclut une étape chimique de reformation de l'intermédiaire oxétane issu des adduits (6-4) lors de la reconnaissance enzymatique. Cette réaction pourrait être peu efficace et l'adduit (6-4) rester partiellement sous sa forme ouverte, dont la réduction n'aboutit pas à la restauration des deux bases thymine. Il est également possible que la lésion soit convertie en son isomère de Dewar, ce qui diminuerait d'autant le rendement de réparation.²⁶

Conclusion

La réduction électrochimique des molécules modèles des deux types de lésions photo induites conduit à la coupure du cycle à quatre atomes. Le processus de transfert d'électron couplé à une rupture de liaison homolytique est séquentiel avec tous les modèles étudiés, sauf pour le thiétane, dont la vague n'est pas suffisamment définie pour pouvoir se prononcer. Dans la famille des cyclobutanes, les dimères de configuration *syn* sont réduits plus facilement que les dimères *anti*, comme nous l'avons observé en oxydation. La coupure des modèles peut être vue comme un transfert d'électron intramoléculaire vers l'orbitale σ^* de la liaison coupée C(5)–C(5'), ce qui explique la barrière d'activation liée à cette réaction. La réduction électrochimique des oxétanes modèles provoque d'abord la coupure hétérolytique de la liaison C–O. Les mécanismes suggérés par la voltamétrie sont appuyés par des modélisations quantiques qui confirment le caractère séquentiel du processus transfert d'électron coupure de liaison.

Les résultats obtenus en électrochimie ne permettent pas de conclure quant au passage par le radical anion du dimère de type cyclobutane au cours de la réparation enzymatique de

l'ADN. Néanmoins, l'évaluation de la vitesse de transfert d'électron entre FADH^{-*} et un modèle de lésion ($c,s\text{-DMT} \rightleftharpoons \text{DMT}$) à partir de paramètres thermodynamiques tirés de notre étude et de la littérature indique que le mécanisme le plus probable est séquentiel (chemin **A** \rightarrow **B** \rightarrow **D**, schéma 25).

BIBLIOGRAPHIE

-
- ¹ Heelis, P. F., Kim, S.-T., Ojamura, T. et Sancar, A. (1993) The photo repair of pyrimidine dimers by DNA photolyase and model systems, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **17**, 219-228.
- ² Hélène, C. et Charlier, M. (1971) Photosensitized splitting of pyrimidine dimers by indole derivatives, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 252-257.
- ³ Heelis, P. F., Deeble, D. J., Kim, S. T et Sancar, A. (1992) Splitting of a cis-syn cyclobutane thymine-thymine dimers by radiolysis and its relevance to enzymatic photoreactivation, *Int. J. Radiat. Biol.*, **62**, 137-143.
- ⁴ Pouwels, P. J. W., Hartman, R. F., Rose, S. D. et Kaptein, R. (1995) Photo-CIDNP study of pyrimidine dimers splitting II: reactions involving pyrimidine radical anion intermediates, *Photochem. Photobiol.*, **61**, 575-583.
- ⁵ Yeh, S.-R. et Falvey, D. E. (1991) Model studies of DNA photorepair: radical anion cleavage of thymine dimers probed by nanosecond laser spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8557-8558.
- ⁶ Scannell, M. P., Prakash, G. et Falvey, D. E. (1997) Photoinduced electron transfer to pyrimidines and 5,6-dihydropyrimidine derivatives: reduction potentials determined by fluorescence quenching kinetics, *J. Phys. Chem. A*, **101**, 4332-4337.
- ⁷ (a) Eppele, E., Wallenborn, E.-U. et Carell, T. (1997) Investigation of flavin-containing DNA-repair model compounds, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 7440-7451. (b) Butenandt, J., Eppele, E., Wallenborn, E.-U., Eker, A. P. M., Gramlich, V. et Carell, T. (2000) A comparative repair study of thymine- and uracil-photodimers with model compounds and a photolyase repair enzyme, *Chem. Eur. J.*, **6**, 62-72.
- ⁸ (a) Joseph, A., Prakash, G. et Falvey, D. E. (2000) Model studies of the (6-4) photoproduct photolyase enzyme : laser flash photolysis studies confirm radical ion intermediates in the repair of thymine oxetane adducts, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11219-11225. (b) Prakash, G. et Falvey, D. E. (1995) Model studies of the (6-4) photoproduct DNA photolyase : synthesis and photosensitized splitting of a Thymine-5,6-oxetane, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 11375-11376. (c) Joseph, A. et Falvey, D. E. (2002) Photoinduced electron transfer cleavage of oxetane adducts of uracil and cytosine, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1**, 632-635.
- ⁹ (a) Cichon, M. K., Arnold, S. et Carell, T. (2002) A (6-4) photolyase model : repair of DNA (6-4) lesions requires a reduced and deprotonated flavin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 767-770.

(b) Friedel, M. G., Cichon, M. K. et Carell, T. (2005) Model compounds for (6-4) photolyases: a comparative flavin induced cleavage study of oxetanes and thietanes, *Org. Biomol. Chem.*, **3**, 1937-1941.

¹⁰ Nadjo, L. et Savéant, J. M. (1973) Linear sweep voltammetry : kinetic control by charge transfer and or secondary chemical reaction. I. Formal kinetics. *Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **48**, 113-145.

¹¹ (a) Marcus, R. A. (1956) On the theory of oxidation-reduction involving electron transfer. I. *J. Chem. Phys.*, **24**, 966-978. (b) Hush, N. S. (1958) Adiabatic rate processes at electrodes. I. Energy-charge relationships, *J. Chem. Phys.*, **28**, 962-972. (c) Marcus, R. A. (1977) *Theory and applications of electron transfers at electrodes and in solution*, dans Special Topics in Electrochemistry, Rock, P. A., Ed.; Elsevier: New York; pp 161-179. (d) Marcus, R. A. et Sutin, N. (1985) Electron transfers in chemistry and biology, *Biophys. Biochim. Acta*, **811**, 265-322

¹² Meneses, A. B., Antonello, S., Arévalo, M. C. et Maran, F. (2006) Double layer correction for electron-transfer kinetics at glassy carbon and mercury electrodes in *N,N*-dimethylformamide, *Electroanalysis*, **18**, 363-370.

¹³ Harrison, C. B., O'Neil, L. L. et Wiest, O. (2005) Computational studies on DNA photolyase, *J. Phys. Chem. A*, **109**, 7001-7012.

¹⁴ Voityuk, A. A. et Rösch, N. (1997) Ab initio study on the structure and splitting of the uracil dimer anion radical, *J. Phys. Chem. A*, **101**, 8335-8338.

¹⁵ Wang, Y., Gaspar, P. P. et Taylor, J. S. (2000) Quantum chemical study of the electron-transfer-catalyzed splitting of oxetane and azetidine intermediates proposed in the photoenzymatic repair of (6-4) photoproducts of DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5510-5519.

¹⁶ (a) Andrieux, C. P., Robert, M., Saeva, F. D. et Savéant, J.-M. (1994) Passage from concerted to stepwise dissociative electron transfer as a function of the molecular structure and of the energy of the incoming electron. Electrochemical reduction of aryldialkyl sulfonium cations, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 7864-7871. (b) Pause, L., Robert, M. et Savéant, J.-M. (1999) Can single-electron transfer break an aromatic carbon-heteroatom bond in one step? A novel example of transition between stepwise and concerted mechanisms in the reduction of aromatic halides, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 7158-7159. (c) Antonello, S. et Maran, F. (1999) The role and relevance of the transfer coefficient α in the study of dissociative electron transfers: concepts and examples from the electroreduction of perbenzoates, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9668-9676.

-
- ¹⁷ Mees, A., Klar, T., Gnau, P., Hennecke, U., Eker, A. P. M., Carell, T et Essen, L.-O. (2004) Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair, *Science*, **306**, 1789-1793.
- ¹⁸ Vande Berg, B. J. et Sancar, G. B. (1998) Evidence for dinucleotide flipping by DNA photolyase, *J. Biol. Chem.*, **273**, 20276-20284.
- ¹⁹ Park, H., Zhang, K., Ren, Y., Nadji, S., Sinha, N., Taylor, J.-S. et Kang, C. H. (2002) Crystal structure of a DNA decamer containing a *cis-syn* thymine dimer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15965-15970.
- ²⁰ Kao, Y.-T., Saxena, C., Wang, L., Sancar, A. et Zhong, D. (2005) Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 16128-16132.
- ²¹ Harrison, C. B., O'Neil, L. L. et Wiest, O. (2005) Computational studies on DNA photolyase, *J. Phys. Chem. A*, **109**, 7001-7012.
- ²² Gindt, Y. M., Schelvis, J. P. M., Thoren, K. L. et Huang, T. H. (2005) Substrate binding modulates the reduction potential of DNA photolyase, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10472-10473.
- ²³ Boussicault, F., Krüger, O., Robert, M. et Wille, U. (2004) Dissociative electron transfer to and from pyrimidine cyclobutane dimers: an electrochemical study, *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 2742-2750.
- ²⁴ (a) Robert, M. et Savéant, J.-M. (2000) Photoinduced dissociative electron transfer: is the quantum yield theoretically predicted to equal unity ?, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 514-517. (b) Costentin, C., Robert, M. et Savéant, J.-M. (2000) Stepwise and concerted pathways in thermal and photoinduced electron-transfer/bond-breaking reactions, *J. Phys. Chem. A*, **104**, 7492-74501.
- ²⁵ Hitmoi, K., Kim, S.-T., Iwai, S., Harima, N., Otsoshi, E., Ikenaga, M. et Todo, T. (1997) Binding and catalytic properties of *Xenopus* (6-4) photolyase, *J. Biol. Chem.*, **272**, 32591-32598.
- ²⁶ Kim, S. T., Malhotra, K., Smith, C. A., Taylor, J. S. et Sancar, A. (1994) Characterization of (6-4) photoproduct DNA photolyase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 8535-8540.

CHAPITRE 3

Réparation des modèles par la photolyase
d'*Escherichia coli*

Introduction

La photolyase a été découverte à la fin des années 50, ¹ le gène responsable de son expression a été identifié et amplifié pour la première fois dans la bactérie *Escherichia coli* en 1978. ² Les gènes de photolyases ont ensuite été trouvés chez des eucaryotes tels que la drosophile, ³ le poisson rouge ⁴ et les marsupiaux. ⁵ Cette découverte a permis de cultiver des enzymes photolyases en quantité importante, ce qui a ouvert la voie à de nombreuses études pour élucider la structure de l'enzyme, ⁶ comprendre son mode de fonctionnement, ⁷ notamment les interactions précises qui lui permettent de reconnaître les lésions. Nous y reviendrons plus loin dans ce chapitre, mais notons déjà que Sancar et al ont étudié l'influence de la présence de la chaîne phosphatée, du sucre pentose, de la séquence des bases et de la stéréochimie de la lésion sur son affinité avec l'enzyme et l'efficacité de la réparation. ⁸ Ils ont notamment montré que la photolyase ADN de *E. coli* a une certaine affinité et répare un simple dimère de thymine, même si la constante d'association est 10^5 fois plus faible qu'avec un même dimère inclus dans un brin d'ADN. ⁸

Zaitsev et son équipe ont étudié la dépendance de l'activité de la photolyase ADN de *E. coli* avec la concentration en substrat, ce qui a permis de déterminer la constante de Michaelis de l'enzyme (K_M), qui s'élève à 100 nM. ⁹ Batschauer et Carell se sont intéressés au suivi dans le temps de la réparation de modèles de lésions par les photolyases ADN de *A. nidulans* et *A. thaliana*, en suivant la réparation par HPLC et fluorescence. ¹⁰ En dehors de ces travaux, très peu d'études cinétiques sur l'activité des photolyases ont été faites. ¹¹

Nos résultats obtenus par électrochimie indiquent que cette méthode de détection pourrait être utilisée pour suivre la cinétique de réparation des lésions, tout du moins des modèles tels que ceux que nous avons étudiés. A notre connaissance, un seul travail utilisant l'électrochimie comme outil de suivi de la réparation enzymatique de dimères de thymine inclus dans des oligonucléotides a été publié, par le groupe de Barton. ¹² La mise en œuvre en est complexe et l'interprétation des résultats très délicate. Des dimères de thymine sont inclus dans des oligonucléotides courts (15 paires de bases environ) fonctionnalisés à l'une des extrémités 5' par un groupement thiol SH. Les brins s'autoassemblent sur des électrodes d'or, qui sont ensuite totalement recouvertes avec du mercaptohexanol afin de couvrir les zones encore nues. Après introduction de l'enzyme photolyase à ADN dans une solution où plonge l'électrode d'or modifiée, un signal électrochimique de faible amplitude est détecté, signal attribué à l'oxydation du cofacteur flavine ($FADH^+$) de l'enzyme. Celle-ci reconnaît la

lésion et une communication électronique s'établirait entre l'or et la flavine via le brin d'ADN. Après irradiation avec une lumière monochromatique ($\lambda = 366$ ou 470 nm) le signal électrochimique augmente, ce qui est attribué par Barton à une meilleure communication électronique entre la flavine et l'or, en raison de la restauration d'une séquence de bases "normale" après réparation du dimère de thymine. Puis, progressivement, le signal décroît par dissociation du complexe enzyme-oligonucléotide.

Notre idée est à la fois plus simple et plus directe. Il s'agit de suivre au cours du temps la réparation de lésions (modèles) par leur réponse électrochimique en oxydation. En effet, le signal de nos molécules devrait être observable dans l'eau, milieu de la réparation enzymatique. Nous avons choisi la photolyase ADN d'*Escherichia coli*, photolyase la plus étudiée, et nous avons étudié la réparation de dimères de thymine de type cyclobutane par cette enzyme. De façon plus inattendue, cette méthode nous a permis d'accéder à des informations mécanistiques sur la réparation des lésions (6-4).

1 Réparation enzymatique des dimères de type cyclobutane

1-1 Détection électrochimique du substrat

Le substrat que nous avons choisi est le *c,s*-DMT \leftrightarrow DMT, car c'est celui qui se rapproche le plus, parmi nos modèles, du substrat naturel de l'enzyme. La vague anodique du dimère (voir figure 31), située vers $+1,7$ V vs. ECS, est nettement séparée de celle de la DMT, et suffisamment positive pour rester détectable en présence d'eau.

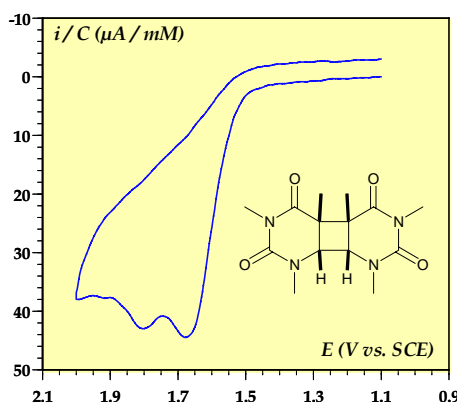


Figure 31. Oxydation du *c,s*-DMT \leftrightarrow DMT sur une électrode de carbone vitreux dans ACN.
 $C = 2,00$ mM, $v = 0,1$ V s⁻¹.

Nous avons préparé des solutions de tampon biologique Tris HCl 20 mM ($pH = 7,8$), contenant du NaCl (50 mM), de l'EDTA (1 mM), du dithiotrétyl (DTT, 10 mM), du glycérol (25 % en volume), et le dimère (environ 30 mM). Nous les avons ensuite diluées cent fois dans l'acétonitrile pour en faire la voltamétrie cyclique. Un exemple de vague obtenue est présenté sur la figure 32.

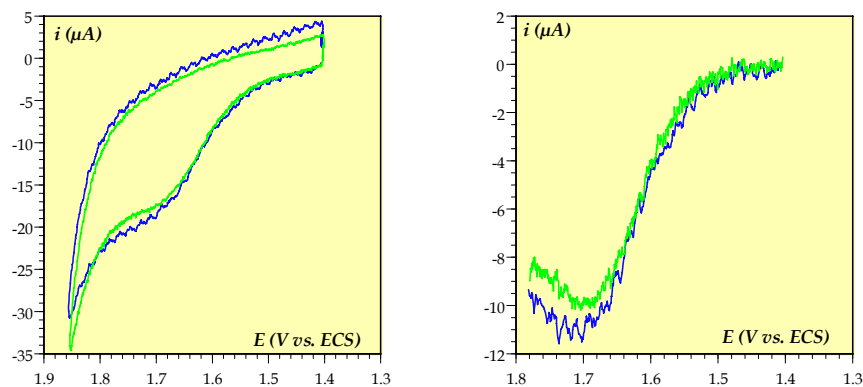


Figure 32. Oxydation du *c,s*-DMT \leftrightarrow DMT (0,32 mM) avant (bleu) et après 60 minutes d'irradiation sans enzyme (vert). $v = 0,2 \text{ V s}^{-1}$.
Gauche : voltamogrammes bruts. Droite : voltamogrammes après retrait de la ligne de base.

Le signal du dimère est bien défini, mais en raison de l'avancée du mur du solvant, causée par la présence de l'eau, et de la faible concentration du substrat ($\sim 0,1 \text{ mM}$) le pic de la vague est difficile à distinguer. Pour améliorer le signal, une solution consiste à retirer au voltamogramme la ligne de base obtenue dans le solvant seul. Un exemple illustratif est donné sur le graphe de droite de la figure 32. On notera aussi que le signal oxydatif du monomère DMT n'est pas observé, car situé à des potentiels plus élevés que l'oxydation de l'eau présente dans le milieu.

Nous avons vérifié que le dimère n'est pas sensible au rayonnement UV-visible incident en l'irradiant avec une lampe à xénon (100 W) pendant une heure, sans enzyme et sous atmosphère inerte (argon). Nous avons pris soin de filtrer les rayons dont la longueur d'onde est inférieure à 360 nm pour éviter de reformer le dimère pendant l'irradiation. Le courant du dimère ne baisse quasiment pas, il n'est donc pas dégradé. Une éventuelle baisse du courant dans nos expériences de réparation enzymatique serait donc bien imputable à l'action de la photolyase.

1-2 Suivi de la réparation enzymatique

Les expériences de réparation du *c,s*-DMT \leftrightarrow DMT ont été menées dans les conditions suivantes : le dimère est mélangé à 25 μ g d'enzyme dans 25 μ l de tampon biologique Tris HCl 20 mM ($pH = 7,8$), contenant du NaCl (50 mM), de l'EDTA (1 mM), du dithiotrétyol (DTT, 10 mM) et du glycérol (25 % en volume). Cette solution a ensuite été irradiée avec une lampe à xénon (100 W), en filtrant les longueurs d'onde inférieures à 360 nm. Au cours de l'irradiation, des volumes de 5 μ l du mélange réactionnel sont prélevés et dilués cent fois dans l'ACN, à intervalles de temps réguliers (5, 20, 40 et 60 minutes). Les résultats de cette expérience sont illustrés sur la figure 33.

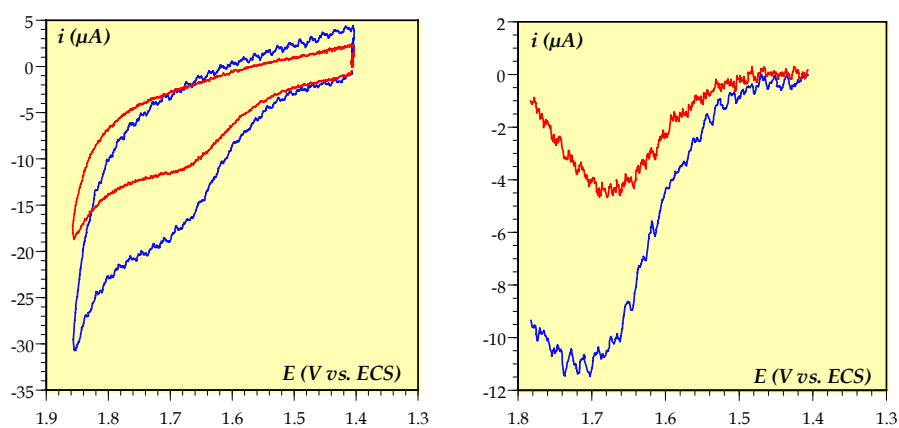


Figure 33. Voltamétrie du *c,s*-DMT \leftrightarrow DMT (0,32 mM) en présence de photolyase. $t_{\text{irradiation}}$: 0 (bleu), 20 minutes (rouge). $v = 0,2 \text{ V s}^{-1}$.

Gauche : voltamogrammes bruts. Droite : voltamogrammes après retrait de la ligne de base.

Les courbes obtenues montrent que la réparation enzymatique du *c,s*-DMT \leftrightarrow DMT a bien lieu. Sur quatre expériences indépendantes, la réparation du dimère s'élève à $54 \pm 10 \%$. Une certaine irreproductibilité des résultats a été observée, due à la préparation de l'enzyme (particulièrement à l'étape de décongélation).

Nous avons également vérifié que la réparation n'a pas lieu dans le noir. Après une heure, une solution contenant le dimère et l'enzyme conduit à la mesure d'un courant ayant diminué d'environ 5 % par rapport à la vague initiale. Ceci est dû au fait que l'obscurité n'est pas complète et éventuellement à une faible activité de l'enzyme dans ces conditions. Cette réparation résiduelle participe sans doute à l'incertitude sur la mesure du rendement de réparation.

1-3 Discussion

Une étude de Sancar et al. a montré que la photolyase ADN d'*E. coli* est capable de reconnaître et réparer des dimères de thymine (de configuration *cis,syn* ou *trans,syn*) inclus dans des oligonucléotides de longueurs différentes.⁸ La réparation a notamment lieu avec un dinucléotide contenant un dimère de configuration *cis,syn*. La constante d'association avec l'enzyme est beaucoup plus faible pour ce substrat ($10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1}$) que pour un dimère inclus dans un oligonucléotide ($10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1}$), mais les rendements quantiques de réparation sont très similaires dans les deux cas. La réparation d'un simple dimère de thymine, sans le déoxyribose, a également été observée, malgré une faible reconnaissance par l'enzyme. Cela montre que l'affinité de la photolyase ADN pour son substrat est pour une partie importante liée à des interactions avec le dimère lui-même, essentiellement des liaisons hydrogène entre des résidus présents dans la poche catalytique et les fonctions carbonyles portées par les atomes C(2) (C(2')) et C(4) (C(4')), ainsi qu'avec les protons portés par l'azote N(3) (N(3')) des motifs thymine du dimère. La structure du complexe photolyase-substrat, élucidée par Carell et al, a permis récemment d'identifier clairement ces liaisons hydrogène (figure 34).¹³

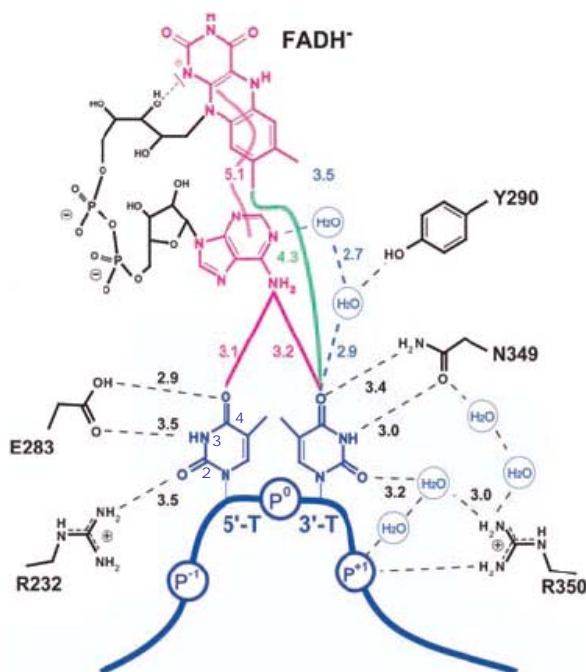


Figure 34. Structure du site catalytique de la photolyase ADN d'*A. nidulans* en présence de deux bases thymine (tirée de la référence 14, longueurs en Å).

Avec le *c,s*-DMT \leftrightarrow DMT, les liaisons hydrogène entre d'une part les fonctions carbonyle des motifs thymine, et d'autre part les résidus présents dans la poche de l'enzyme et les molécules d'eau sont maintenues. Dans nos conditions de concentration, une affinité existe donc entre le

dimère modèle et l'enzyme, ce qui nous a permis de détecter et quantifier une réparation enzymatique de nos modèles.

Le rendement de réparation de nos modèles est de l'ordre de 50 %. Cette activité importante est à mettre en parallèle du rendement quantique de réparation élevé de la photolyase d'*E. coli* ($\Phi = 0,9$).¹⁴ On remarque qu'au bout d'un certain temps d'irradiation (environ 40 minutes, mais ce temps est assez peu reproductible), il n'y a plus de réparation supplémentaire, ce qui suggère que l'enzyme est capable de réparer un nombre limité de lésions.

Nous avons alors eu l'idée de tester par notre méthode l'activité de la photolyase ADN d'*E. coli* sur des modèles de lésion (6-4) (oxétanes et thiétane). Notons tout d'abord que les photolyases ADN reconnaissent des formes fermées de type cyclobutane et fonctionnent avec le même cofacteur flavine FADH^- que les (6-4) photolyases, qui elles ne reconnaissent pas des analogues thiétane de la forme oxétane de la lésion biologique.¹⁵ Nos oxétanes modèles contiennent un cycle fermé et conservent un motif thymine, par lequel ils pourraient contracter des liaisons hydrogène avec les résidus présents dans le site catalytique. De plus, leur taille est similaire à celle du *c,s*-DMT \leftrightarrow DMT, ce qui doit leur permettre de pénétrer dans la poche enzymatique. Ainsi, la reconnaissance par la photolyase ADN de modèles de l'oxétane aboutirait à la formation de complexes enzyme-substrat qui seraient des mimes de l'intermédiaire clef du mécanisme supposé de la catalyse par transfert d'électron ayant lieu au sein des photolyases (6-4) (voir schéma 27 page 97).

2 Réparation enzymatique des modèles d'adduits (6-4)

2-1 Réparation enzymatique d'un oxétane modèle

Le substrat que nous avons choisi est l'oxétane **3**, dont la structure est rappelée figure 35. Sa vague anodique se situe à un potentiel légèrement moins positif que celui du *c,s*-DMT \leftrightarrow DMT étudié précédemment (1,60 V vs. ECS à 0,1 V s⁻¹), ce qui en fait un bon candidat pour une détection dans les conditions expérimentales de la réparation enzymatique.

Une solution d'oxétane **3** (30 mM), dissous dans un tampon biologique Tris HCl 20 mM (*pH* = 7,8), contenant du NaCl (50 mM), de l'EDTA (1 mM), du dithiotrétyol (DTT, 10 mM) et du glycérol (25 % en volume), a été irradiée pendant une heure sous atmosphère inerte, en filtrant les rayons dont la longueur d'onde est inférieure à 360 nm. La solution est

ensuite diluée cent fois dans l'ACN pour pouvoir l'étudier en voltamétrie cyclique. Le substrat n'est pas dégradé par les rayons UV (figure 35). Nous avons ensuite irradié une solution comprenant la photolyase ADN d'*E. coli* et l'oxétane **3** dans les mêmes conditions, en faisant des prélèvements à différents temps d'irradiation (5, 20, 40 et 60 minutes) pour mesurer la variation de la concentration de l'oxétane (figure 36).

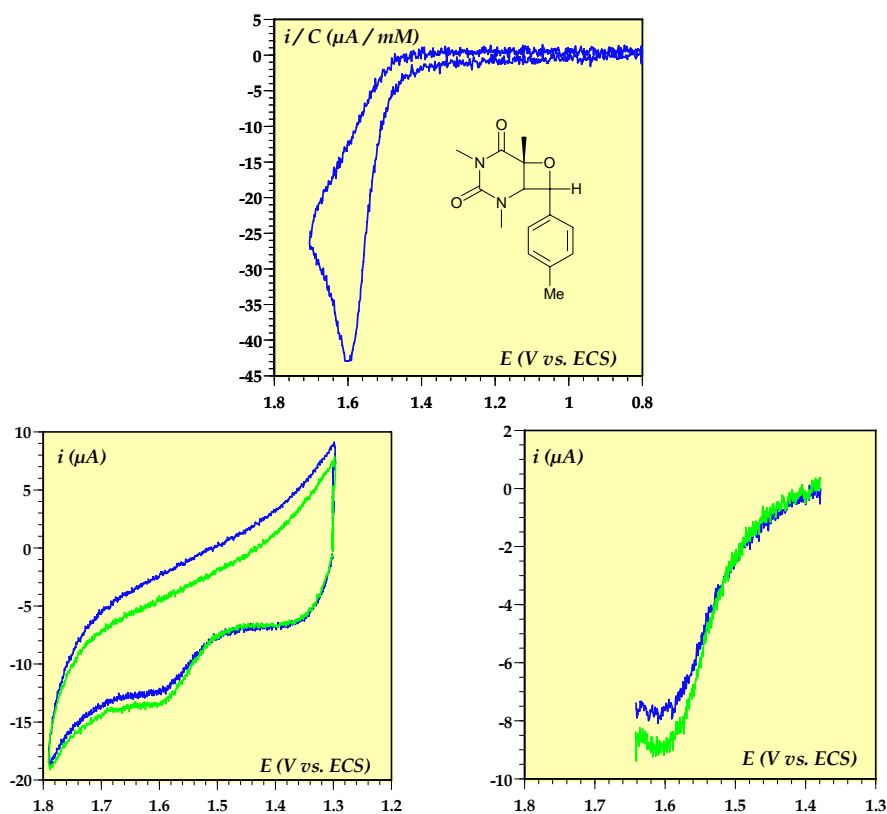


Figure 35. Haut : oxydation de l'oxétane **3** ($C = 1,42 \text{ mM}$) dans l'ACN. $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.
 Bas: oxydation de l'oxétane **3** ($C = 0,3 \text{ mM}$) avant (bleu) et après 60 minutes (vert) d'irradiation sans enzyme.
 Gauche: voltamogrammes bruts. Droite: voltamogrammes après retrait de la ligne de base.
 $\nu = 0,2 \text{ V s}^{-1}$.

La concentration en oxétane **3** diminue au cours du temps d'irradiation, donc la photolyase ADN reconnaît et répare l'oxétane **3**. La réparation de ce modèle s'élève à 30 % au bout de 60 minutes d'irradiation. Il apparaît que la présence du motif thymine est suffisante pour qu'il y ait une certaine affinité entre l'enzyme et le substrat, et réparation catalytique. Ces résultats sont une preuve expérimentale que le mécanisme enzymatique de réparation des adduits (6-4) de l'ADN passe par la reformation d'un oxétane intermédiaire, ensuite réduit par l'enzyme. Nous allons revenir sur ce point dans la suite.

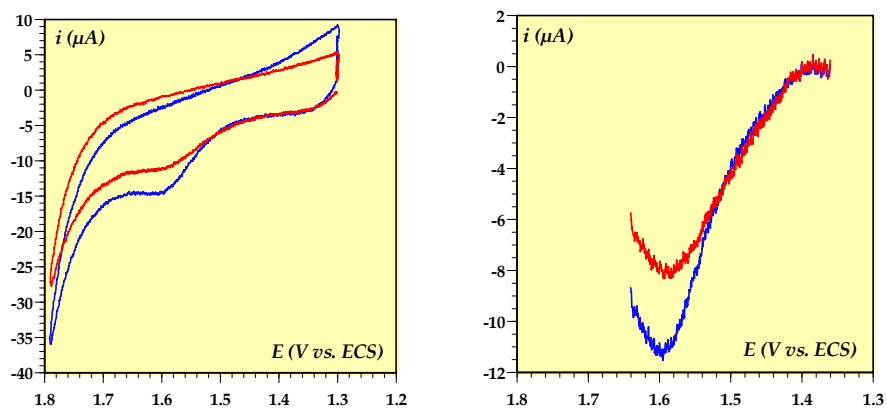


Figure 36. Voltamétrie de l'oxétane 3 (0,3 mM) en présence d'enzyme. $t_{\text{irradiation}}$: 0 (bleu), 60 minutes (rouge).
Gauche : voltamogrammes bruts. Droite: voltamogrammes après retrait de la ligne de base.
 $v = 0,2 \text{ V s}^{-1}$.

2-2 Réparation enzymatique du thiétane

Le thiétane modèle (figure 37) est un autre mime de l'oxétane issu des adduits (6-4). Sa structure est très proche de celle de l'oxétane supposé intervenir dans la réparation enzymatique des adduits (6-4). Sa vague d'oxydation se situe à + 1,3 V vs. ECS à $0,1 \text{ V s}^{-1}$, elle est donc elle aussi suffisamment avancée pour être détectée dans les conditions expérimentales de la réparation enzymatique.

Nous avons alors préparé une solution de thiétane (10 mM) dans le tampon biologique Tris HCl 20 mM ($\text{pH} = 7,8$), contenant du NaCl (50 mM), de l'EDTA (1 mM), du dithiotrétyl (DTT, 10 mM) et du glycérol (25 % en volume). Cette solution a été diluée cent fois dans l'ACN pour la voltamétrie, les voltamogrammes obtenus sont présentés sur la figure 37.

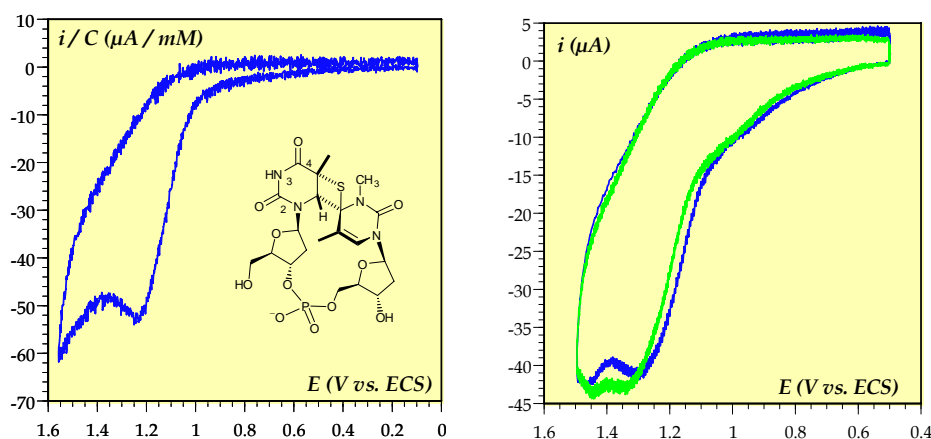


Figure 37. Gauche : oxydation du thiétane (1,67 mM) dans le DMF. $v = 0,2 \text{ V s}^{-1}$.
Droite: oxydation du thiétane (0,10 mM) avant (bleu) et après 60 minutes (vert) d'irradiation sans enzyme dans l'ACN. $v = 0,3 \text{ V s}^{-1}$.

Le signal du thiétane est bien défini. Une solution de thiétane, dissous dans un tampon biologique Tris HCl 20 mM ($pH = 7,8$), contenant du NaCl (50 mM), de l'EDTA (1 mM), du dithiotrétyl (DTT, 10 mM) et du glycérol (25 % en volume), a été irradiée pendant une heure sous atmosphère inerte, et en filtrant les rayons dont la longueur d'onde est inférieure à 360 nm. Le thiétane n'est pas dégradé (figure 37). De même que précédemment, nous avons irradié un mélange de l'enzyme et du thiétane suivant le protocole décrit ci-dessus. Les résultats sont présentés figure 38. La concentration en thiétane diminue d'environ 50 % après 60 minutes d'irradiation. Le thiétane est réparé par la photolyase ADN. Cette valeur est probablement une sous estimation de l'activité réelle de l'enzyme. En effet, le 4-thiouracile, dont la structure est proche de celle de la 4-thiothymine formée suite à la rupture du thiétane, a une absorbance non nulle autour de $\lambda = 360$ nm. Une partie des photons incidents est donc absorbée par la base thiolée, ce qui diminue l'activité apparente de l'enzyme.

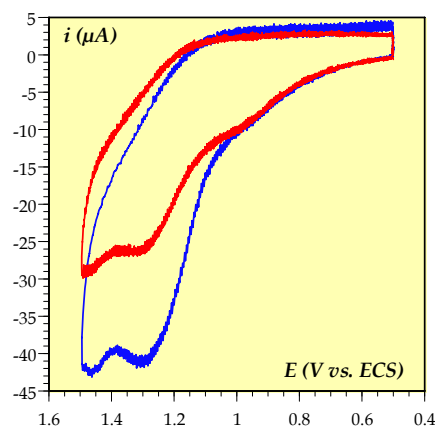


Figure 38. Voltamétrie du thiétane (0,10 mM) en présence de photolyase.
 $t_{irradiation}$: 0 (bleu), 60 minutes (rouge). $v = 0,3 \text{ V s}^{-1}$.

La photolyase ADN d'*E. coli* répare le thiétane de manière aussi efficace que le dimère de thymine de type cyclobutane. Cette réparation enzymatique du thiétane montre que celui-ci peut entrer dans la poche catalytique de l'enzyme. La reconnaissance par l'enzyme est rendue possible via des liaisons hydrogène avec les fonctions cétones des deux motifs thymine ainsi qu'avec l'atome d'hydrogène porté par l'azote N(3). La réparation observée, plus importante qu'avec l'oxétane **3**, indique que l'enzyme reconnaît mieux le thiétane, probablement en raison du plus grand nombre de sites susceptibles de contracter des liaisons hydrogène avec les résidus enzymatiques.

2-3 Conséquences sur le mécanisme de réparation enzymatique des photoproduits pyrimidine (6-4) pyrimidone

Comme nous l'avons dit en introduction, un mécanisme possible de réparation enzymatique des adduits (6-4) implique la formation d'un oxétane intermédiaire, qui serait ensuite coupé par transfert d'électron dissociatif, le donneur pouvant être une flavine à l'état excité (FADH^*).¹⁶ La formation de l'oxétane serait catalysée par deux résidus histidine, His³⁵⁴ et His³⁵⁸.¹⁷ His³⁵⁸ joue le rôle de base vis à vis de la fonction alcool portée par le carbone C(5), et His³⁵⁴, chargé positivement, jouerait le rôle d'acide vis à vis de l'azote N(3') porté par l'autre motif thymine (schéma 27). Le doublet électronique libre résultant, porté par l'oxygène, attaquerait le carbone C(4') pour former le motif oxétane.¹⁷

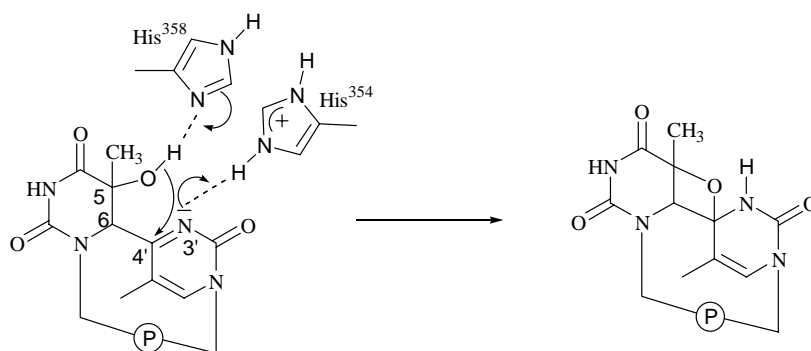


Schéma 27. Formation de l'intermédiaire oxétane à partir de l'adduit (6-4) au sein du site catalytique d'une (6-4) photolyase.

Cette proposition a reçu un début de confirmation dans un travail de Carell et son équipe.¹⁸ A partir d'un système comprenant une flavine reliée de manière covalente à un oxétane (schéma 28), ils ont suivi par HPLC la reformation de la base thymine sous irradiation UV. La coupure du motif oxétane n'a lieu que si la flavine est réduite et déprotonnée (FADH^-).¹⁸

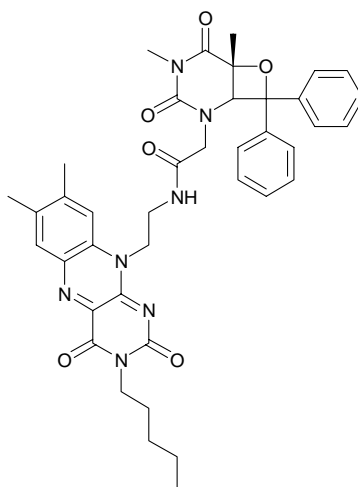


Schéma 28. Molécule modèle pour étudier la réparation des lésions oxétane de l'ADN.

FADH⁻ étant un cofacteur des (6-4) photolyases et la forme ouverte de la lésion ne pouvant pas conduire à la restauration de la séquence normale du brin d'ADN par transfert d'électron, l'expérience réalisée constitue un indice qu'un mécanisme catalytique de réparation par transfert de charge dissociatif est suivi.

Notre étude apporte des éléments de preuve supplémentaires. Nous avons en effet montré que la photolyase ADN peut reconnaître et réparer par un mécanisme de transfert d'électron des mimes (oxétane, thiétane) de la forme fermée des lésions de l'ADN de type adduit (6-4). Nous pensons qu'il s'agit là d'une véritable preuve expérimentale que la réparation enzymatique des adduits (6-4) se fait par un transfert électronique photoinduit impliquant d'une part la flavine réduite et protonnée, excitée à son état singulet, et un intermédiaire de type oxétane d'autre part.

Conclusion

Nous avons utilisé la voltamétrie cyclique comme moyen de détection de la réparation enzymatique de composés modèles de lésions photoinduites de l'ADN. Cette méthode, relativement simple à mettre en œuvre, tire profit du fait que les vagues anodiques des composés étudiés sont le reflet direct de leur concentration en solution. Les courants de pic mesurés sont suffisamment importants pour détecter une baisse de concentration du substrat due à sa consommation par l'enzyme. Toutefois on ne vérifie pas directement la re-formation des monobases thymine car leur vague oxydative se situe après le mur du solvant dans ces conditions.

L'étude de la réparation enzymatique de nos composés modèles a permis de vérifier que la photolyase ADN est capable de reconnaître et réparer un dimère cyclobutane de configuration *cis,syn*. La reconnaissance se fait par des liaisons hydrogène entre les fonctions cétone des motifs thymine, et des résidus présents dans la poche catalytique. On peut envisager maintenant d'étudier la réparation de lésions incluses dans des brins d'ADN. L'étude d'un tel système nous permettrait de nous rapprocher des conditions de réparation réelles, à condition d'utiliser des oligonucléotides suffisamment longs. Des expériences préliminaires de détection de lésions de type cyclobutane insérés dans un brin court ont été entreprises au laboratoire. La réparation de modèles de l'oxétane issu des photoproduits (6-4) par la photolyase ADN apporte des éléments supplémentaires montrant que le mécanisme de

réparation enzymatique des adduits (6-4) passe par la re-formation d'un cycle oxétane intermédiaire subissant une réduction dissociative dans un second temps.

BIBLIOGRAPHIE

-
- ¹ Voir une reproduction de l'article original: Cleaver, J. E. (2003) Photoreactivation. *DNA repair* 2, 629-638.
- ² (a) Sancar, A. et Rupert C. S. (1978) Cloning of the *phr* gene and amplification of photolyase in *Escherichia coli*. *Gene*, **4**, 295-308. (b) Sancar, G. B., Smtih, F. W. et Sancar, A. (1983) Identification and amplification of the *E. coli phr* gene product. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 6667-6678.
- ³ Todo, T., Ryo, H., Takemori, H., Toh, H., Nomura, T. et Kondo, S. (1994) High-level expression of the photorepair gene in *Drosophila* ovary and its evolutionary implications. *Mutat. Res.*, **315**, 213-228.
- ⁴ Yasuhira, S. et Yasui, A. (1992) Visible light-inducible photolyase gene from the goldfish *Carassius auratus*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 25644-25647.
- ⁵ Kato, T., Todo, T., Ayaki, H., Ishizaki, H., Morita, T., Mitra, S. et Ikenaga, M. (1994) Cloning of a marsupial DNA photolyase gene and the lack of related nucleotide sequences in placental mammals. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4119-4124.
- ⁶ (a) Park, H. W., Kim, S. T., Sancar, A. et Deisenhofer, J. (1995) Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science*, **268**, 1866-1872. (b) Tamada, T., Kitadokoro, K., Higuchi, Y., Inaka, K., Yasui, A., de Ruiter, P. E., Eker, A. P. M. et Miki, K. (1997) Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 887-891. (c) Komori, H., Masui, R., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Shibata, T., Inoue, Y. et Miki, K. (2001) Crystal structure of thermostable DNA photolyase : pyrimidine-dimer recognition mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 13560-13565.
- ⁷ Vande Berg, B. J. et Sancar, G. B. (1998) Evidence for dinucleotide flipping by DNA photolyase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20276-20284.
- ⁸ Kim, S.-T. et Sancar, A. (1991) Effect of base, pentose, and phosphodiester backbone structures on binding and repair of pyrimidine dimers by *Escherichia coli* DNA photolyase. *Biochemistry*, **30**, 8623-8630.
- ⁹ Nakayama, T., Todo, T., Notsu, S., Nakazono, M. et Zaitzu, K. (2004) Assay method for *Escherichia coli* photolyase activity using single-stranded *cis-syn* cyclobutane pyrimidine dimer DNA as substrate. *Anal. Biochem.*, **329**, 263-268.

-
- ¹⁰ Kundu, L. M., Burgdorf, L. T., Kleiner, O., Batschauer, A. et Carell, T. (2002) Cleavable substrate containing molecular beacons for the quantification of DNA-photolyase activity. *ChemBioChem*, **3**, 1053-1060.
- ¹¹ Hada, M., Hino, K., Buchholz, G., Goss, J., Wellmann, E. et Shin, M. (2000) Assay of DNA photolyase activity in spinach leaves in relation to cell compartmentation-evidence for lack of DNA photolyase in chloroplasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1288-1291.
- ¹² DeRosa, M. C., Sancar, A. et Barton, J. K. (2005) Electrically monitoring DNA repair by photolyase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 10788-10792.
- ¹³ Mees, A., Klar, T., Gnau, P., Hennecke, U., Eker, A. P. M., Carell, T et Essen, L.-O. (2004) Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair, *Science*, **306**, 1789-1793.
- ¹⁴ Sancar, A. (2003) Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem. Rev.*, **103**, 2203-2237.
- ¹⁵ Zhao, X., Liu, J., Hsu, D. S., Zhao, S., Taylor, J.-S. et Sancar, A. (1997) Reaction mechanism of (6-4) photolyase, *J. Biol. Chem.*, **272**, 32580-32590.
- ¹⁶ Kim, S. T., Malhotra, K., Smith, C. A., Taylor, J. S. et Sancar, A. (1994) Characterization of (6-4) photoproduct DNA photolyase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 8535-8540.
- ¹⁷ Hitomi, K., Nakamura, H., Kim, S.-T., Mizukochi, T., Ishikawa, T., Iwai, S. et Todo, T. (2001) Role of two histidines in the (6-4) photolyase reaction. *J. Biol. Chem.*, **276**, 10103-10109.
- ¹⁸ Cichon, M. K., Arnold, S. et Carell, T. (2002) A (6-4) photolyase model : repair of DNA (6-4) lesions requires a reduced and deprotonated flavin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 767-770.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le travail présenté dans ce mémoire se situe à la frontière entre la physicochimie et la biologie. Il constitue une tentative d'application des concepts et des méthodes de l'électrochimie moléculaire à la compréhension des mécanismes de réparation de lésions de l'ADN. Nous avons étudié par voltamétrie cyclique des mimes de lésions de l'ADN, induites par le rayonnement UV de la lumière au niveau d'un site thymine-thymine. Ces lésions peuvent être des dimères de type cyclobutane de configuration *cis,syn* ou *trans,syn*, ou des adduits (6-4). Ces deux types de lésions sont réparés par la photolyase ADN et la (6-4) photolyase, deux enzymes aux structures très proches (elles possèdent notamment le même cofacteur catalytique flavine adénine dinucléotide FAD). La photolyase ADN répare les cyclobutanes selon un mécanisme dont l'étape clé est un transfert d'électron dissociatif depuis l'état excité de son cofacteur flavine, réduit et protonné (FADH^*), vers la lésion. Le mécanisme de réparation des adduits (6-4) par des photolyases (6-4) spécifiques restait spéculatif au départ de notre étude. Une possibilité suggérée dans la littérature est que l'enzyme catalyse la reformation de la forme fermée de la lésion (oxétane), qui est ensuite réduite pour aboutir à la restauration de deux bases thymine. Pour mimer ces deux réactions et apporter de nouveaux éléments de compréhension des mécanismes intimes de réparation, nous avons étudié des dimères de type cyclobutane de thymines et d'uraciles méthylées, avec différentes configurations autour du cycle à quatre atomes. Pour les adduits (6-4) nous avons étudié des oxétanes modèles, issus de l'addition d'une thymine méthylée et de carbonyles aromatiques, ainsi qu'un thiétane dont la structure est très proche de l'oxétane suggéré comme intermédiaire clef dans la réparation enzymatique.

L'oxydation électrochimique, bien que non suivie lors de la réparation biologique, nous a permis d'observer la rupture du cycle central des deux types de lésions, les cyclobutanes et les oxétanes. Avec tous ces composés, le mécanisme suivi est séquentiel, c'est-à-dire que le transfert d'électron et la première rupture de liaison se font en deux étapes distinctes. La configuration *syn* ou *anti* (cycle central) influe sensiblement sur le potentiel d'oxydation des dimères de type cyclobutane, les dimères *syn* étant beaucoup plus faciles à oxyder que les *anti* (un écart de plus de 370 mV est estimé entre les potentiels standard du *cis,syn*-DMU \rightleftharpoons DMU et du *cis,anti*-DMU \rightleftharpoons DMU par exemple). Avec les oxétanes nous avons mis en lumière une régiosélectivité de l'oxydation selon la nature des substituants présents sur la partie benzénique des modèles étudiés. Avec l'oxétane **4**, dans lequel le substituant est un groupe méthoxy, la perte de l'électron se fait sur la partie benzénique. Par contre avec les oxétanes **1**, **2** et **3**, la partie benzénique est moins facile à oxyder que la partie thymine, c'est donc cette dernière qui perd un électron. Le mécanisme est identique dans son

schéma d'ensemble à celui suivi par les cyclobutanes. La similitude des potentiels standard et des constantes de vitesse de coupure estimées en est le reflet. Nos modélisations quantiques suggèrent que la barrière d'activation associée à la première coupure homolytique de liaison trouve son origine dans un transfert d'électron intramoléculaire vers l'orbitale σ^* de la liaison rompue. Le thiétane est le seul modèle pour lequel l'oxydation n'induit pas la coupure du cycle, la fonction sulfure est oxydée en sulfoxyde puis en sulfone.

La réduction des composés modèles à une électrode permet de mimer les étapes clés de la réparation enzymatique des lésions de l'ADN. La réduction des cyclobutanes et des oxétanes conduit à la rupture du cycle central, suivant un mécanisme séquentiel. De même qu'en oxydation, les cyclobutanes de configuration *syn* sont plus faciles à réduire que ceux de configuration *anti* (l'écart estimé entre les potentiels standard du *cis,syn*-DMT \leftrightarrow DMT et du *cis,anti*-DMT \leftrightarrow DMT est de 140 mV). Avec les oxétanes, aucune régiosélectivité du transfert électronique n'a été observée. Des calculs quantiques laissent penser qu'un transfert d'électron intramoléculaire est à l'origine de la barrière d'activation associée à la première coupure homolytique de liaison des cyclobutanes. La réduction du thiétane conduit également à la coupure du cycle à quatre atomes, mais le mécanisme précis n'a pas pu être élucidé. Nos conclusions ne peuvent pas être directement transposées au mécanisme de réparation enzymatique en raison des différences avec le contexte biologique (environnement de la poche catalytique au sein de l'enzyme). Néanmoins, plusieurs études récentes, ainsi que nos propres évaluations des constantes de vitesse du transfert d'électron initial entre la flavine et la lésion, suggèrent plutôt le passage par un radical anion du cyclobutane lors de la réparation enzymatique au sein de la photolyase ADN. Le rendement quantique élevé de réparation des cyclobutanes par la photolyase ADN ($\Phi \approx 0,9$) peut s'expliquer dans ce cadre par le fait que le transfert d'électron retour du radical anion vers la flavine à l'état fondamental est très lent (région inverse).

La suite de notre travail s'est alors orientée vers les aspects biologiques du sujet. En effet la voltamétrie cyclique nous permet de suivre la réparation de nos composés modèles par une enzyme photolyase ADN. Les expériences avec le *c,s*-DMT \leftrightarrow DMT montrent que l'enzyme reconnaît ce substrat, grâce à des liaisons hydrogène avec les fonctions cétone portées par les motifs thymine du dimère, et le répare. Une suite possible sera de suivre la réparation enzymatique de cyclobutanes inclus dans des brins d'ADN, des travaux préliminaires sur des oligonucléotides courts ont été entrepris. De manière plus surprenante, la photolyase ADN d'*E. coli* est capable de reconnaître et réparer l'oxétane **3** et le thiétane. Cela peut s'expliquer par la conservation (par rapport au dimère de type cyclobutane) d'un motif

thymine permettant une association via des liaisons hydrogène entre l'oxétane (ou le thiétane) et l'enzyme. Ces résultats constituent selon nous une preuve expérimentale que le mécanisme de réparation enzymatique des adduits (6-4) implique la formation d'un intermédiaire oxétane, suivie de sa réduction par le cofacteur flavine.

Si ce travail a permis de mieux comprendre l'étape intime de réparation enzymatique des lésions photoinduites de l'ADN, plusieurs directions pourront être suivies à l'avenir pour lever les incertitudes qui subsistent. Par exemple les constantes de vitesse de coupure réductrice des cyclobutanes n'ont pas pu être estimées par électrochimie. Cette donnée est importante dans le cadre qui nous intéresse, et également dans la conception d'édifices moléculaires à partir de brins d'ADN et dont le fonctionnement est basé sur le transfert de charge négative à travers la double hélice. Par exemple, Carell a étudié le transfert d'un électron dans des brins d'ADN fonctionnalisés avec un donneur électronique (flavine), et contenant une lésion de type cyclobutane.¹ La flavine et la lésion sont séparées de quelques bases. Suite à l'excitation de la flavine, le transfert d'électron a lieu et le dimère se coupe, ce qui montre qu'il y a transport de charge à travers le brin. L'étape qui limite la cinétique du processus n'est pas connue (injection de l'électron, transport de charge à travers le brin, coupure du motif cyclobutane ?). L'électrochimie pourrait apporter une contribution à la résolution de cette question. Un autre axe de recherche à approfondir serait la conception de photolyases artificielles, qui pourraient reconnaître et réparer les lésions au sein de l'ADN. Cela pourrait ouvrir la voie à la synthèse d'un médicament pour prévenir les cancers de la peau. Enfin il serait intéressant d'utiliser les outils de l'électrochimie moléculaire pour l'étude d'autres lésions de l'ADN, notamment les bases thymine halogénées. Ces lésions sont dues aux inflammations des tissus biologiques, potentiellement cancérigènes.² Des études préliminaires faites au laboratoire ont montré que la réduction de tels composés aboutit à la coupure de la liaison carbone-halogène.

¹ (a) Haas, C., Kräling, K., Cichon, M., Rahe, N. et Carell, T. (2004) Excess electron transfer driven DNA does not depend on the transfer direction, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 1842-1844.
(b) Behrens, C. et Carell, T. (2003) Excess electron transfer in flavin-capped, thymine dimer-containing DNA hairpins, *Chem. Commun.*, 1632-1633.

² Henderson, J. P., Byun, J., Takeshita, J. et Heinecke, J. W. (2003) Phagocytes produce 5-chlorouracil and 5-bromouracil, two mutagenic products of myeloperoxidase, in human inflammatory tissue, *J. Biol. Chem.*, **278**, 23522-23528.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1 Manipulations électrochimiques

1-1 Voltamétrie cyclique linéaire

Le potentiel d'une électrode fixe et de surface constante est balayé de façon linéaire au cours du temps de manière à injecter ou prendre un électron au composé étudié. Les signaux obtenus sont enregistrés sous forme de voltammogrammes, c'est-à-dire de courbes qui représentent la variation de l'intensité du courant collecté par rapport au potentiel de l'électrode.

En voltamétrie dite "classique", les vitesses de balayage sont comprises entre $0,05 \text{ V s}^{-1}$ et 1000 V s^{-1} (le diamètre des électrodes peut alors varier entre 3 mm et 0,2 mm).

1.1.1) Appareillage

Le schéma général du montage utilisé en voltamétrie "classique" est donné sur la figure 39. C'est un montage à trois électrodes qui comprend :

- une électrode de travail (ET)
- une électrode de référence (Réf) de potentiel fixe
- une contre-électrode (CE) qui collecte le courant

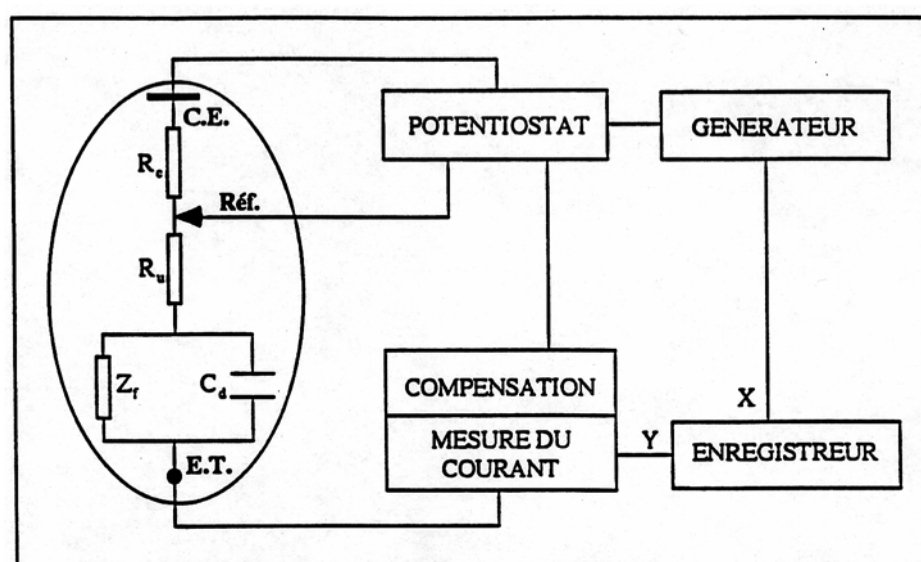


Figure 39. Schéma du montage à trois électrodes. E.T. : électrode de travail, C.E. : contre-électrode, Réf : électrode de référence, C_d : capacité de double couche, Z_f : impédance faradique, R_c : résistance de la cellule compensée, R_u : résistance réelle de la cellule.

Un potentiostat, réalisé au laboratoire, permet d'imposer à l'électrode de travail un potentiel connu relativement à l'électrode de référence, et variant linéairement avec le temps. Le signal triangulaire est délivré par un générateur EGG PARC modèle 175. Un système électronique compense la résistance (R_u) existant entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. Ce phénomène de chute ohmique entraîne un déplacement du potentiel de pic, une diminution de sa hauteur et son élargissement. Ces effets sont d'autant plus importants que les courants sont élevés et deviennent donc gênants à grande vitesse de balayage. Les voltamogrammes sont enregistrés sur un oscilloscope numérique NICOLET 310 puis transférés sur un PC pour être ensuite traités.

1.1.2) Cellule électrochimique

La cellule comporte une double enveloppe qui permet, par un système de circulation d'eau (régulateur de température M3 LAUDA), de thermostatier le système (voir figure 40).

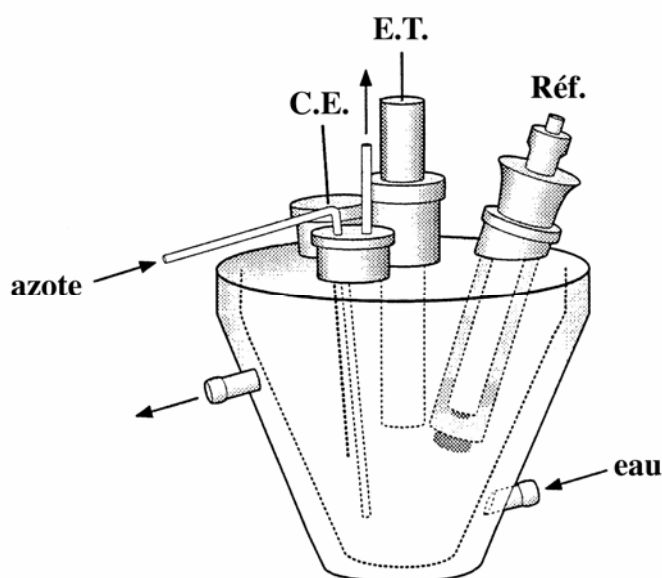


Figure 40. Cellule électrochimique. E.T. : électrode de travail, C.E. : contre-électrode, Réf : électrode de référence.

1.1.3) Electrodes

Les électrodes de travail sont des disques de carbone vitreux (Tokai Carbon) de diamètre variable suivant la vitesse de balayage. Des barreaux de 3 mm sont utilisés à basse

vitesse tandis qu'aux vitesses les plus élevées le diamètre de l'électrode est de 1 mm. Cette dernière est obtenue à partir d'un barreau de 3 mm taillé en pointe par abrasion mécanique. Ces électrodes sont soigneusement polies sur un disque abrasif tournant puis sur différents draps de polissage avec des pâtes de diamant (Struers ou Presi) de 15 μm , 6 μm , 3 μm et enfin 1 μm (avant chaque balayage), avant d'être rincées à l'éthanol absolu sous agitation ultrasonique.

La contre-électrode est un fil de platine plongeant directement dans la solution et l'électrode de référence est une électrode aqueuse saturée au calomel (Tacussel XR 110). Elle est isolée du reste de la solution par un pont contenant une solution d'électrolyte support dans le solvant organique employé.

1.1.4) Mode opératoire

En voltamétrie "classique", les solutions étudiées (dans 5 ou 10 cm^3) sont préparées avec une concentration moyenne en substrat variant de 1 à 2 mM et une concentration de 0,1 M en électrolyte support (tétrafluoroborate de tétrabutylammonium $\text{n-Bu}_4\text{NBF}_4$, noté TBAF). Dans toutes les expériences, l'oxygène est éliminé par barbotage d'argon. Entre deux enregistrements, la solution est agitée par un courant d'argon de façon à homogénéiser la solution au voisinage de l'électrode.

Pour le suivi de la réparation enzymatique au cours du temps, les solutions étudiées ont un volume moindre, de 0,3 à 0,5 cm^3 , et sont préparées avec des concentrations de l'ordre de 0,1 mM de substrat et 0,1 M de sel de fond (TBAF), en présence de 1 % de tampon aqueux Tris HCl 20 mM (pH 7,8) avec du NaCl 50 mM, de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) 1 mM, du dithiothréitol (DTT) 10 mM, du serum d'albumine bovine (BSA) à 0,05 mg mL^{-1} et 25 % de glycérol en volume.

1-2 Electrolyse à potentiel contrôlé

1.2.1) Appareillage

Une baie réalisée au laboratoire intègre un potentiostat, qui contrôle le potentiel et permet une compensation de la chute ohmique, un coulomètre, pour mesurer la quantité de courant passée à travers le système, un millivoltmètre pour contrôler le potentiel de travail et un microampèremètre pour mesurer le courant.

1.2.2) Montage et électrodes

Le montage utilisé comprend trois électrodes, une électrode de travail, une contre-électrode, isolée du reste du montage dans un compartiment terminé par un fritté, et une électrode de référence. L'électrode de travail et la contre-électrode sont en feutre de carbone, qui offre une plus grande surface de travail. L'électrode de référence est une électrode aqueuse saturée au calomel. Les solutions sont agitées magnétiquement, désoxygénées par barbotage d'argon et placées dans un volume de 10 ml ($C = 2 \text{ mM}$).

2 Produits chimiques

2-1 Solvants et électrolyte support

Le diméthylformamide (Fluka, puriss 99,5 + %, stocké sur tamis moléculaire et sous atmosphère inerte) et l'acétonitrile (Fluka, puriss 99,5 + %, stocké sur tamis moléculaire et sous atmosphère inerte) ont été utilisés sans purification supplémentaire. L'électrolyte support est le tétrafluoroborate de tétrabutylammonium ($n\text{-Bu}_4\text{NBF}_4$, Fluka, puriss 99,5 + %). Il est séché sous vide avant chaque utilisation.

2-2 Substrats

2.2.1) Produits commerciaux

Les produits suivants ont été utilisés sans purification supplémentaire :

- Thymine (Sigma, minimum 99 %)
- Uracile (Sigma, minimum 99 %)
- N,N' -diméthyluracile (Aldrich, 99 %)
- 5,6-dihydro-5-méthyluracile (Lancaster, 98 + %)
- 4-Thiouracile (Acros, 97 %)
- Benzophénone (Prolabo)
- Benzaldéhyde (Aldrich, 99 %)
- p-Tolualdéhyde (Aldrich, 97 %)
- p-Anisaldéhyde (Aldrich, 98 %)

- Benzhydrol (Aldrich, 99 %)
- Alcool benzylique (Aldrich, 98 %)
- Alcool p-méthylbenzylique (Aldrich, 99 %)
- Alcool p-méthoxybenzylique (Aldrich, 98 %)
- 2,2,2-trifluoroéthanol (Aldrich, 99,5 + %)
- Acide acétique (Prolabo, rectapur 98 %)
- Riboflavine (Sigma)
- Dithionite de sodium (Aldrich, 85 %)

La photolyase d'*Escherichia coli* est commandée chez Trevigen, elle est livrée conditionnée dans 40 µl de tampon de stockage. Elle est conservée à – 80°C dans des aliquots de travail de 10 µl chacun.

2.2.2) N,N'-diméthylthymine

La diméthylthymine est synthétisée par méthylation de la base thymine en milieu basique. 5 g de thymine sont dissous dans 25 ml d'eau contenant 4,5 g de KOH (0,08 mol). La solution, qui devient claire sous agitation magnétique, est amenée à 0°C. On ajoute ensuite au mélange 10 ml de diméthyl sulfate (0,1 mol) goutte à goutte tout en continuant l'agitation. Une fois l'addition terminée, la solution est retirée de la glace puis chauffée jusqu'à ébullition. Le mélange est ensuite extrait avec trois aliquots de CH₃Cl (25 ml), les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est éliminé par évaporation rotative. Le solide obtenu est recristallisé deux fois dans l'éthanol absolu et filtré sur Buchner. Le produit final est un solide blanc (1,75 g, 28% de rendement) caractérisé par son point de fusion, mesuré à 140°C, et par analyse RMN du proton : RMN ¹H (DMSO) : δ 7,56 (s, 1H), δ 3,26 (s, 3H), δ 3,16 (s, 3H), δ 1,79 (s, 3H).

2.2.3) Dimères de type cyclobutane

Les dimères de type cyclobutane ont été synthétisés par cycloaddition [2π + 2π], en irradiant une solution de monomère. Les photons absorbés excitent les pyrimidines à leur état triplet, ce qui induit la formation du cyclobutane.

DMU ↔ *DMU* : 520 mg de DMU sont dissous dans 80 ml d'acétone dans un réacteur en pyrex de 100 ml, dont on chasse l'air en bullant avec de l'argon. Le mélange est ensuite irradié sous argon avec une lampe à Xénon (Oriol 66002) d'une puissance de 150 W pendant 10 h. L'isomère *cis,syn* a été obtenu par recristallisation dans l'éthanol absolu. RMN ^1H (CDCl_3) : δ 4,08 (m, 2H), δ 3,79 (m, 2H), δ 3,16 (s, 6H), δ 3,01 (s, 6H).

DMT ↔ *DMT* : 680 mg de DMT sont dissous dans 80 ml d'acétone dans un réacteur en pyrex de 100 ml, dont on chasse l'air en bullant avec de l'argon. Le mélange est ensuite irradié sous argon avec une lampe à Xénon (Oriol 66002) d'une puissance de 150 W pendant 3 jours. Après évaporation du solvant par évaporation rotative, l'isomère *cis,syn* a été séparé par chromatographie sur colonne de gel de silice. Les produits ont été élués successivement avec de l'éther sec contenant 1% puis 2% d'éthanol, et avec du méthanol. RMN ^1H (CDCl_3) : δ 3,72 (s, 2H), δ 3,14 (s, 6H), δ 3,00 (s, 6H), δ 1,51 (s, 6H).

2.2.4) Oxétanes modèles

Le principe de la synthèse est le même que celui des cyclobutanes, les oxétanes ont été produits suivant un mécanisme de type Paterno-Büchi, une cycloaddition $[2\pi + 2\pi]$ de la thymine méthylée avec un carbonyle aromatique déclenchée par irradiation. L'absorption d'un photon par le carbonyle excite ce dernier sous son état triplet, ce qui va induire la formation de l'oxétane via la cycloaddition de la double liaison C=O du carbonyle avec la double liaison carbone-carbone de la thymine méthylée. Les protocoles suivis sont les suivants : 2 mmol de N,N'-DMT et 4 mmol de carbonyle aromatique (benzophénone, benzaldéhyde, p-méthylbenzaldéhyde ou p-méthoxybenzaldéhyde) sont dissous dans 20 ml d'ACN dans une cuve en quartz. L'air est ensuite purgé avec de l'argon pendant 30 minutes avant l'irradiation, le mélange est ensuite irradié avec une lampe à Xénon (Oriol 66002), d'une puissance de 150 W pendant 5 heures. Les oxétanes ont été purifiés sur colonne de silice avec un mélange d'acétate d'éthyle / cyclohexane (de proportions 20 / 80 à 40 / 60 en volume) comme éluant et caractérisés par RMN du proton.

Oxétane 1 : Synthétisé par cycloaddition de N,N'-DMT (0,400 g) et de benzophénone (0,730 g), on a obtenu 66 mg d'oxétane **1** (rdt 7%). RMN ^1H (CDCl_3) : δ 7,38 (m, 10H), δ 4,58 (s, 1H), δ 3,13 (s, 3H), δ 2,86 (s, 3H), δ 1,74 (s, 3H).

Oxétane 2 : Synthétisé par cycloaddition de N,N'-DMT(0,300 g) et de benzaldéhyde. (0,5 ml), on a obtenu 42 mg d'oxétane **2** (rdt 8%). RMN ^1H (CDCl_3) : δ 7,40 (m, 5H), δ 5,48 (d, $J = 10$ Hz, 1H), δ 3,90 (d, $J = 10$ Hz, 1H), δ 3,33 (s, 3H), δ 2,98 (s, 3H), δ 2,38 (s, 3H), δ 1,80 (s, 3H).

Oxétane 3 : Synthétisé par cycloaddition de N,N'-DMT (0,300 g) et de p-méthylbenzaldéhyde (0,5 ml), on a obtenu 35 mg d'oxétane **3** (rdt 6%). RMN ^1H (CDCl_3) : δ 7,25 (q, 4H), δ 5,45 (d, $J = 10$ Hz, 1H), δ 3,87 (d, $J = 10$ Hz, 1H), δ 3,33 (s, 3H), δ 2,99 (s, 3H), δ 1,79 (s, 3H).

Oxétane 4 : Synthétisé par cycloaddition de N,N'-DMT (0,300 g) et de p-méthoxybenzaldéhyde (0,5 ml), on obtient 4 mg d'oxétane **4** (rdt 0,7%). RMN ^1H (CDCl_3) : δ 7,33 (d, $J = 1,7$ Hz, 2H), δ 6,95 (d, $J = 2$ Hz, 2H), δ 6,95 (d, $J = 2$ Hz, 2H), δ 5,41 (d, $J = 0,6$ Hz, 1H), δ 3,83 (m, 4H), δ 3,33 (s, 3H), δ 2,97 (s, 3H), δ 1,80 (s, 3H).

3 Réparation enzymatique des modèles de lésion

3-1 Réparation du *cis,syn*-DMT \leftrightarrow DMT

0,33 mg de cyclobutane sont dissous dans une solution mère de 30 μl de tampon aqueux Tris HCl 20 mM (pH 7,8), en présence de NaCl (50 mM), d'EDTA (1 mM), de DTT (10 mM), et de BSA (0,1 mg mL^{-1}). 10 μl de cette solution sont utilisés pour la réparation enzymatique, 10 μl sont utilisés pour l'irradiation du dimère sans enzyme, les 10 derniers μl sont utilisés pour mesurer le courant d'oxydation du dimère avant l'irradiation.

3.1.1) Irradiation du dimère avec l'enzyme

10 μl de la solution mère et un aliquot de 10 μl contenant l'enzyme sont mélangés. Ce mélange est mis dans une cuve en pyrex, dont l'air est chassé par bullage avec de l'argon, et irradié pendant 1 heure avec une lampe à Xénon (Oriol 66002) d'une puissance de 100 W, en filtrant le rayonnement de longueur d'onde inférieure à 360 nm. Des volumes de 5 μl ont été prélevés à 5, 20, 40 et 60 minutes dans des tubes eppendorf de 500 μl enroulés dans du papier

aluminium pour les protéger de la lumière, puis dilués 100 fois dans la solution électrolytique (ACN + TBAF 0,1 M) pour en faire la voltamétrie.

3.1.2) Irradiation du dimère sans enzyme

10 μ l de la solution mère sont dilués dans 10 μ l de tampon aqueux. Le protocole suivi par la suite est le même que celui pour l'irradiation en présence d'enzyme.

3.1.3) Témoin non irradié

10 μ l de la solution mère sont dilués dans 10 μ l de tampon aqueux. 5 μ l de cette solution sont ensuite dilués dans 0,5 ml d'ACN contenant du sel de fond (TBAF) à 0,1 M.

3-2 Réparation de l'oxétane 3 et du thiétane

Pour l'étude de la réparation de ces composés modèles par la photolyase, le même protocole que pour le cyclobutane a été suivi, avec quelques modifications suivant le composé étudié.

3.2.1) Oxétane 3

Les 0,32 mg de ce composé nécessaires pour préparer 30 μ l de solution tamponnée à 0,30 mM ne sont pas totalement dissous dans ce volume. Nous avons donc préparé un volume de 45 μ l de solution mère, dont la concentration est de l'ordre de 20 mM. De cette solution, 15 μ l ont été utilisés pour la réparation enzymatique, 15 μ l pour le témoin irradié sans enzyme et 15 μ l pour le témoin non irradié. Pour les deux expériences d'irradiation, le volume irradié est donc de 25 μ l. On en prélève des volumes de 6 μ l que l'on dilue dans 0,5 ml d'acétonitrile contenant du sel de fond en vue de la voltamétrie. Pour le témoin non irradié, les 15 μ l de solution mère sont dilués dans 10 μ l de tampon. On prélève ensuite 6 μ l de cette nouvelle solution, que l'on dilue dans 0,5 ml d'électrolyte support pour en faire la voltamétrie.

3.2.2) Thiétane

La solution mère de thiétane a été préparée par dissolution de 0,54 mg de substrat dans 30 μ l de tampon aqueux, la concentration est donc de 32 mM. Le protocole suivi est ensuite le même que pour la réparation du cyclobutane.

ANNEXES

Annexe 1

Oxydation des monomères N,N'–diméthyluracile (DMU) et N,N'–diméthylthymine (DMT)

Nous avons étudié l'oxydation du DMU et du DMT à une électrode de carbone vitreux millimétrique, en milieu organique aprotique.

Résultats de la voltamétrie cyclique

L'oxydation de ces deux composés se fait suivant une seule vague anodique, irréversible et très positive (figure 41). La vague du DMU se situe à un potentiel de + 2,01 V vs. ECS à 0,1 V s⁻¹, sa largeur à mi-hauteur est de 55 mV à la même vitesse de balayage, le potentiel de pic se déplace linéairement avec cette dernière (+ 24 mV par décade) et ne varie pas avec la concentration de la monobase méthylée.

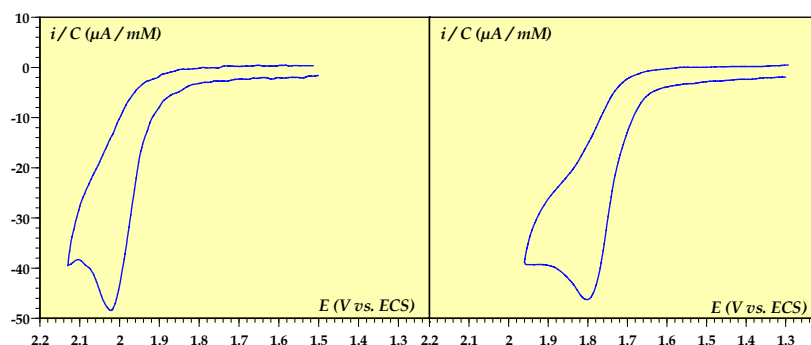


Figure 41. Oxydation du DMU et de la DMT sur une électrode de carbone vitreux millimétrique dans ACN. Gauche : DMU, $C = 2,06$ mM. Droite : DMT, $C = 1,96$ mM. $v = 0,1$ V s⁻¹.

De même que pour les dimères, la stœchiométrie électronique de la vague est calculée par comparaison avec la vague monoélectronique réversible de la benzoquinone dans le même solvant. On reprend donc l'équation (3) établie dans le premier chapitre, en considérant que le substrat et le standard ont le même coefficient de diffusion. Il vient :

$$n = \left(\frac{0,446}{\Psi_p} \right) \left(\frac{i_p}{i_{p_{benzo}}} \right) \left(\frac{C_{benzo}^0}{C^0} \right) \quad (A1)$$

L'oxydation du DMU se fait selon un mécanisme biélectronique ($n_{calculé} = 2,10$).

La vague du DMT se situe elle à un potentiel moins positif que la vague du DMU (+ 1,81 à 0,1 V s⁻¹, figure 41), elle est large de 65 mV, son potentiel de pic se déplace linéairement avec la vitesse de balayage (+ 22 mV par décade) et ne dépend pas de la

concentration du substrat. La stœchiométrie électronique, calculée en appliquant l'équation (A1), montre que le mécanisme suivi implique l'échange de 2 électrons ($n_{\text{calculé}} = 2,07$). Les résultats obtenus indiquent que le diméthyluracile et la diméthylthymine s'oxydent vraisemblablement suivant le même mécanisme. Le fait que le DMT soit plus facile à oxyder que le DMU est sans doute dû au fait que la majeure fraction du spin électronique au niveau du radical cation est localisée sur le carbone C(5) (schéma 29) : la différence de 200 mV est le reflet de la meilleure stabilité du radical cation du DMT, qui est tertiaire, par rapport à celui du DMU, qui est secondaire.

Mécanisme d'oxydation des monobases

Le déplacement du potentiel de pic ainsi que la largeur des vagues des deux monobases méthylées indique que l'oxydation suit un mécanisme séquentiel de transfert d'électron suivi d'une réaction chimique de premier ordre ou pseudo-premier ordre. Le caractère biélectronique des vagues est en accord avec le mécanisme proposé par Uta Wille, dont la première étape est la création d'un radical cation.¹ Le groupe méthyle porté par ce même azote subit une déprotonation, due à l'eau résiduelle présente dans le milieu, suivie de l'éjection d'un deuxième électron (schéma 29). Le cation imminium ainsi formé est ensuite lentement hydrolysé par l'eau résiduelle, ce qui aboutit au remplacement du groupe méthyle initial par un atome d'hydrogène. Ce mécanisme est valable avec le DMU, pour le DMT la déprotonation du radical cation peut également se produire au niveau du groupe méthyle porté par le carbone C(5).

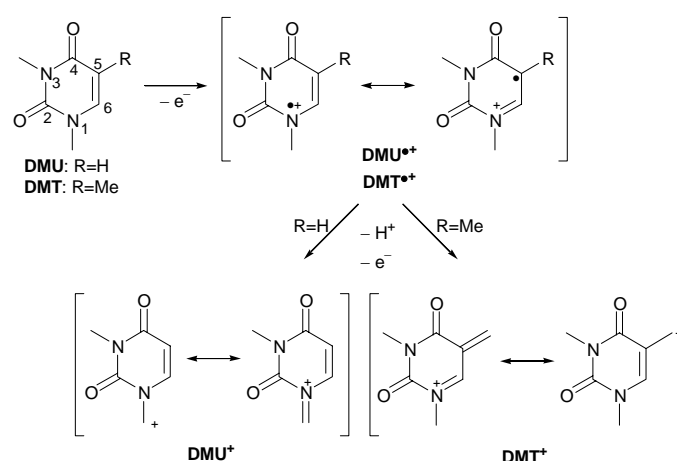


Schéma 29. Mécanisme d'oxydation des monobases DMU et DMT en milieu organique aprotique.

¹ Krüger, O. et Wille, U. (2001) Oxidative cleavage of a cyclobutane pyrimidine dimer by photochemically generated nitrate radicals (NO₃[•]). *Org. Lett.*, **3**, 1455-1458.

Annexe 2

Réduction des monomères N,N'–diméthyluracile (DMU) et N,N'–diméthylthymine (DMT)

Nous avons étudié la réduction du DMU et du DMT à une électrode de carbone vitreux millimétrique, en milieu organique aprotique (DMF).

Résultats de la voltamétrie cyclique

La réduction de ces deux composés se fait suivant une seule vague cathodique, irréversible et très négative (figure 42) à faible vitesse de balayage. La vague du DMU se situe à un potentiel de $-2,32$ V vs. ECS à $0,1$ V s⁻¹, et sa largeur à mi-hauteur est de 55 mV. Le potentiel de pic se déplace linéairement en fonction de $\log v$ (-31 mV par décade) ainsi qu'avec $\log C$ ($+8$ mV par décade), ce qui indique l'interférence d'une réaction bimoléculaire.

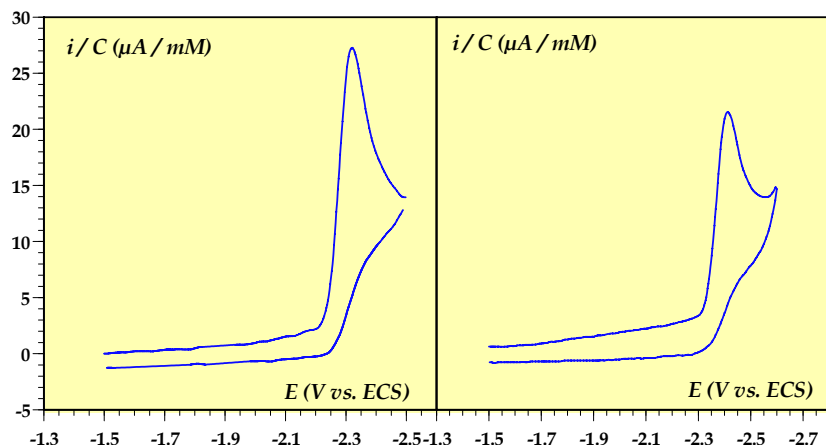


Figure 42. Réduction du DMU et de la DMT sur une électrode de carbone vitreux millimétrique dans ACN.
Gauche : DMU, $C = 2,06$ mM. Droite : DMT, $C = 1,96$ mM. $v = 0,1$ V s⁻¹.

De même que pour les dimères, la stœchiométrie électronique de la vague est calculée par comparaison avec la vague monoélectronique réversible de la benzoquinone dans le même solvant, suivant l'équation (A1). La réduction du DMU se fait selon un mécanisme monoélectronique ($n_{\text{calculé}} = 1,13$).

La vague du DMT se situe elle à un potentiel plus négatif que la vague du DMU ($-2,41$ V à $0,1$ V s⁻¹, figure 42), elle est large de 52 mV, $\partial E_p / \partial \log v = -26$ mV par décade et $\partial E_p / \partial \log C \approx +12$ mV. La stœchiométrie électronique, calculée en appliquant l'équation

(A1), montre que le mécanisme implique l'échange d'un seul électron ($n_{\text{calculé}} = 1,05$). Le diméthyluracile et la diméthylthymine sont réduits suivant un même mécanisme.

Mécanisme de réduction

Le déplacement du potentiel de pic ainsi que la largeur des vagues des deux monobases méthylées indique que la réduction suit un mécanisme séquentiel, au cours duquel le transfert d'électron est suivi d'une réaction chimique de second ordre. Cette réaction est probablement la dimérisation du radical anion produit par le transfert électronique. Des calculs au niveau B3LYP/6-31G* en phase gazeuse sur le radical anion de l'uracile $U^{\bullet-}$ ont montré que la densité de spin est principalement localisée sur l'atome de carbone C(6), comme le montre le schéma 30. Nos calculs semi-empiriques (AM1) ont révélé que la dimérisation sur le carbone C(6) conduit à une structure plus stable (moins contrainte) que la structure issue de la dimérisation en C(4) (schéma 30). Le dimère est donc probablement obtenu par couplage C(6)/C(6').

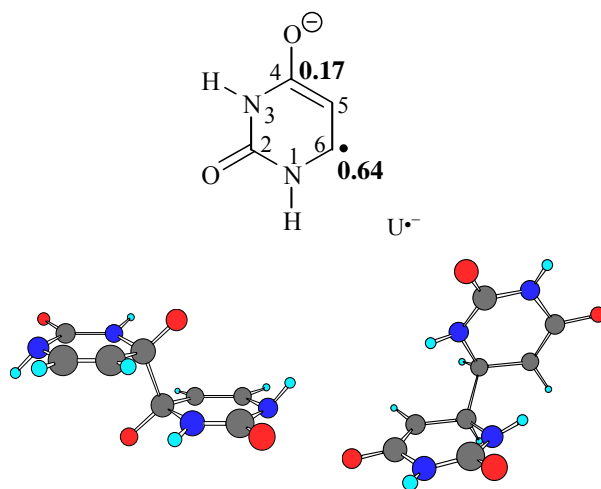


Schéma 30. Haut : densité de spin sur les carbones C(4) et C(6) du radical anion de l'uracile, $U^{\bullet-}$. Bas : dimères obtenus après dimérisation des radicaux anions de l'uracile (gauche : dimérisation C(4) – C(4'), moins stable ; droite : dimérisation sur le C(6) – C(6'), plus favorable).

La réduction du DMT est intrinsèquement plus difficile que celle du DMU, comme en témoigne la différence de 100 mV au niveau du potentiel de pic. En effet, les étapes de transfert d'électron et de dimérisation ont des cinétiques très proches, l'écart des potentiels de pic reflète donc l'écart thermodynamique des potentiels standard des deux couples.

Annexe 3

Tutorial d'électrochimie

Transferts de charge rapide et lent

On s'intéresse aux transferts électroniques qui ont lieu à l'interface solide-liquide entre une électrode et une espèce redox appartenant à un couple A/B ($A + ne^- \rightleftharpoons B$).

Transfert de charge rapide

Pour un transfert de charge hétérogène rapide (i.e. rapide devant les autres phénomènes comme la diffusion ou une réaction chimique), les deux formes oxydée et réduite du couple redox sont à l'équilibre à la surface de l'électrode. Cet équilibre dépend du potentiel de l'électrode suivant la loi de Nernst :

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{C_A^0}{C_B^0} \right)$$

Le courant ne dépend pas de la vitesse du transfert électronique. En effet la vitesse globale de la réaction électrochimique est totalement contrôlée par la vitesse avec laquelle les espèces électroactives arrivent à la surface par le transfert de masse (diffusion, migration ou convection selon la technique utilisée, en voltamétrie cyclique le transfert de masse est assuré par la diffusion).

Transfert de charge lent

Les deux espèces redox ne sont plus en équilibre thermodynamique à la surface de l'électrode, la loi de Nernst n'est donc plus valable. Le courant est alors relié à la vitesse de réaction de transfert de charge par la loi de Butler-Volmer :

$$i = n F S k_s^{\text{app}} e^{-(\alpha n F / RT)(E - E^0)} \left[C_A^0 - C_B^0 e^{(n F / RT)(E - E^0)} \right]$$

Dans cette expression, S représente la surface de l'électrode.

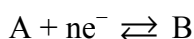
k_s^{app} , appelée constante de transfert de charge hétérogène apparente, varie typiquement de 10^{-3} à quelques cm s^{-1} pour les petites molécules étudiées en électrochimie moléculaire.

La première exponentielle contient le terme $(E - E^0)$, qui représente la force motrice de la réaction (solicitation thermodynamique), et α , appelé coefficient de transfert, qui détermine la fraction de force motrice effectivement utilisée (solicitation cinétique).

Le terme entre crochets montre que le courant est un courant net comprenant deux contributions, l'une pour la réduction, l'autre pour l'oxydation.

Voltamétrie cyclique

La voltamétrie cyclique est une méthode transitoire. Le profil de concentration du substrat dans la couche de diffusion dépend du temps. Elle permet d'accéder à des informations cinétiques sur les processus :



On impose une variation triangulaire de potentiel en fonction du temps, entre un potentiel E_i , auquel A n'est pas électroactif et un potentiel E_f suffisamment négatif pour que la concentration de A soit nulle à la surface de l'électrode (E_f est plus négatif que E^0 , figure 43). Le potentiel est alors ramené à sa valeur de départ. Le processus est généralement conduit à une vitesse de balayage constante (V s^{-1}). L'échange électronique fait apparaître une vague de courant correspondant à la consommation de A à la surface de l'électrode. Pendant la montée de la vague (zone entre E_i et E_{pc} sur le voltamogramme en figure 43), la consommation de A contrôle la cinétique. Une fois la concentration de A proche de 0 au voisinage de la surface de l'électrode, la réaction est limitée par le transport de matière, assuré ici par la diffusion. Le courant atteint alors un pic (en E_{pc}), avant de diminuer (entre E_{pc} et E_f). Cette diminution de courant est due au fait que la diffusion contrôle la cinétique de la réaction. Toutes les informations cinétiques éventuelles sont comprises dans la montée de la vague.

Voltamogrammes réversibles : Cas d'un transfert de charge rapide

Le courant est lié au transfert de masse, assuré par la diffusion :

$$i = nFSD \left(\frac{\partial C_A}{\partial x} \right)_{x=0}$$

D est le coefficient de diffusion de A et de B (supposé identique pour les deux espèces, il vaut généralement de 10^{-6} à $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

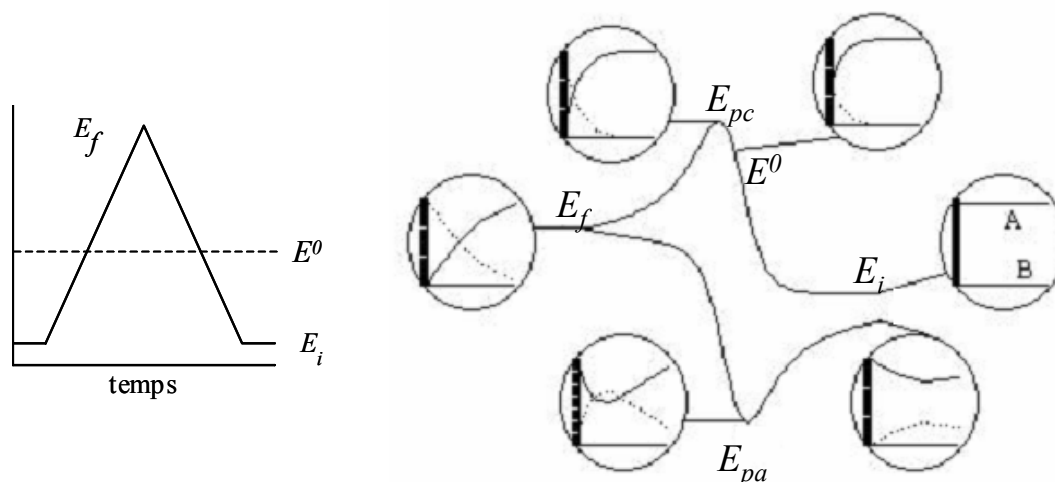


Figure 43. Voltamétrie cyclique. Gauche : évolution du potentiel en fonction du temps. Droite : voltamogramme réversible représenté sous forme de courbe courant-potential, avec les profils de concentration de A (trait plein) et B (pointillés) au voisinage de la surface d'électrode.

Le gradient de concentration à l'électrode peut être relié au potentiel en écrivant la deuxième loi de Fick pour la diffusion de A et de B (diffusion plane semi-infinie) :

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2}$$

la loi de Nernst donnant le rapport des concentrations des deux espèces redox à l'électrode et l'expression du potentiel en fonction du temps. On peut calculer numériquement la courbe courant-potential qui présente un pic (figure 43, vague de réduction comprise entre E_i , E_{pc} et E_f). Ses caractéristiques sont les suivantes :

$$i_{pc} = 0,446 n F S C^0 \sqrt{D} \sqrt{\frac{n F v}{RT}} \quad E_{pc} = E^0 - 1,11 \frac{RT}{nF} \quad [E_{pc/2} - E_{pc}] = 2,20 \frac{RT}{nF}$$

Au retour, le potentiel de pic anodique E_{pa} est le symétrique du potentiel de pic cathodique E_{pc} par rapport au potentiel standard E^0 ; ils sont séparés de $2,20(RT / nF)$ volts.

Le voltamogramme donne accès au potentiel standard du couple A / B mais pas à la cinétique du transfert électronique.

Cas d'un transfert de charge lent.

Le courant s'écrit dans ce cas à partir de la loi de Butler-Volmer, la loi de Nernst n'est plus valable. On obtient une nouvelle fois une courbe à pic dont les caractéristiques sont les suivantes pour le balayage aller (réduction) :

$$i_{pc} = 0,496nFSC^0\sqrt{D}\sqrt{\frac{\alpha Fv}{RT}} \quad E_{pc} = E^0 - 0,78\frac{RT}{\alpha nF} + \frac{RT}{\alpha nF} \ln \left(k_s^{app} \sqrt{\frac{RT}{\alpha nFvD}} \right)$$

$$\left[E_{pc/2} - E_{pc} \right] = 1,85 \frac{RT}{\alpha nF}$$

Cette fois-ci, la vague obtenue (forme, potentiel) dépend de la thermodynamique de la réaction (E^0) et de la cinétique du transfert de charge (k_s^{app}). A partir de l'équation donnant le potentiel de pic, on peut calculer k_s^{app} si on connaît E^0 . On remarque également que E_{pc} devient plus négatif quand on augmente la vitesse de balayage, variant de $(RT / 2\alpha nF)$ quand v augmente d'un facteur 10. Par rapport au transfert de charge nernstien, les pics aller (réduction) et retour (oxydation) s'écartent symétriquement par rapport à E^0 lorsque k_s^{app} diminue et / ou lorsque v augmente. Les vagues deviennent également plus larges.

Influence d'une réaction chimique consécutive : voltamogramme irréversible

Supposons cette fois que le transfert électronique est suivi d'une réaction chimique rapide et irréversible, de constante de vitesse k . Ce type de mécanisme est appelé mécanisme $E + C$ (E pour le transfert électronique, C pour la réaction chimique) :



Sans entrer dans le détail des équations voltamétriques caractérisant un tel mécanisme, on peut discuter qualitativement de l'allure des courbes obtenues.

A basse vitesse de balayage, la réaction chimique consomme complètement B et aucune vague anodique n'est observée lors du balayage retour. Si on peut augmenter la vitesse de balayage suffisamment pour rendre la diffusion plus rapide que la réaction chimique, on verra apparaître une vague d'oxydation de B au retour puisqu'il n'aura pas été totalement consommé. On dit alors qu'on a "rattrapé" la réversibilité chimique du système.

En d'autres termes, pour une vitesse de balayage donnée, si la constante de vitesse k de la réaction chimique est grande, B est complètement consommé et aucune vague d'oxydation n'est observée au balayage retour. Par contre, si la réaction chimique est lente devant le processus de diffusion, on verra apparaître une vague d'oxydation de B au retour (figure 44).

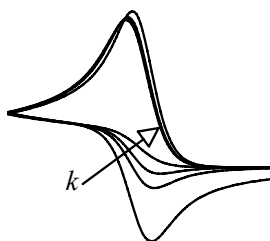


Figure 44. Influence de la constante de vitesse de la réaction chimique sur la réversibilité chimique du voltamogramme.

Si la réaction chimique est rapide, et si en plus le transfert d'électron n'est pas très rapide, il peut devenir impossible de voir une vague d'oxydation au retour, même à vitesse de balayage élevée. Il n'en reste pas moins que l'allure des vagues est caractéristique, avec un déplacement du pic avec v et des largeurs à mi-hauteur intermédiaires entre ceux mesurés pour un transfert de charge rapide et lent.

Mécanisme séquentiel

Comme le mécanisme $E + C$, évoqué plus haut, on suppose que le transfert électronique et la réaction chimique consécutive se font en deux étapes distinctes. On parle alors de mécanisme séquentiel. Prenons l'exemple où A est un composé halogéné RX , dont la réduction aboutit à la coupure de la liaison $R-X$. Alors B est le radical anion $RX^{\bullet-}$, et C représente les fragments coupés R^{\bullet} et X^- . Le processus de réduction est représenté sur la figure 45. Une voie concertée en une étape est également indiquée.

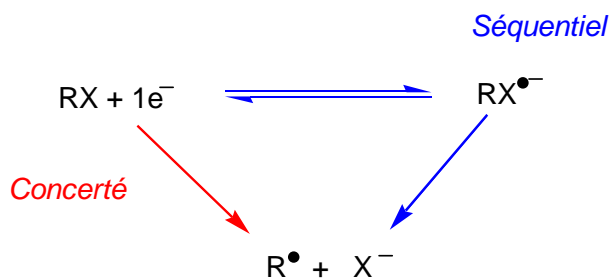


Figure 45. Transfert d'électron couplé à une rupture de liaison. Voies séquentielle et concertée.

Un mécanisme séquentiel sous-entend l'existence et le passage par un radical anion $RX^{\bullet-}$, avant coupure de la liaison $R-X$. Si cette coupure est suffisamment lente, on peut détecter le radical anion en augmentant la vitesse de balayage et ainsi "rattraper" la réaction chimique. On observe alors la réoxydation de $RX^{\bullet-}$ avant qu'il ne soit consommé par la réaction de coupure. Cela se traduit par l'apparition d'une vague anodique retour sur le voltamogramme. Si cette réversibilité chimique ne peut pas être atteinte parce que la réaction

est trop rapide par rapport aux vitesses de balayage expérimentalement accessibles, les caractéristiques de la vague irréversible peuvent encore nous permettre de conclure.

Si la cinétique du processus est gouvernée par la réaction chimique, le transfert de charge agit comme un pré-équilibre, et les déplacements de potentiel et largeur des vagues sont les suivants :

$$\frac{\partial E_p}{\partial \log v} = -\frac{RT}{2F} \ln 10$$

$$E_{p/2} - E_p = 1,85 \frac{RT}{F}$$

E_p et $E_{p/2}$ sont les potentiels de pic et à mi-hauteur respectivement, v étant la vitesse de balayage. Par contre si la cinétique est contrôlée par le transfert électronique, le déplacement du potentiel de pic avec la vitesse de balayage et la largeur de la vague sont :

$$\frac{\partial E_p}{\partial \log v} = -\frac{RT}{\alpha_p 2F} \ln 10$$

$$E_{p/2} - E_p = 1,85 \frac{RT}{\alpha_p F}$$

où α_p est le coefficient de transfert au pic. En pratique, le potentiel de pic mesuré est proche du potentiel standard de formation du radical anion $E_{\text{RX/RX}^\bullet}^0$, et donc si on fait l'hypothèse que le transfert d'électron obéit à la loi cinétique quadratique Marcus-Hush, α_p est proche de 0,5.

Mécanisme concerté

Dans certains cas, transfert d'électron et coupure de liaison peuvent être simultanés, on parle alors de mécanisme concerté. Un mécanisme concerté n'implique pas forcément que le radical anion n'existe pas, mais a minima que le chemin réactionnel ne passe pas par lui. Il est alors impossible d'observer une réversibilité de la vague, quelle que soit la vitesse de balayage. Les caractéristiques de la vague peuvent aussi nous aider à identifier un mécanisme concerté. Comme il y a une coupure de liaison avec le transfert électronique, la barrière intrinsèque à franchir pour que la réaction ait lieu est grande. Le modèle de Savéant conduit à une relation activation – force motrice quadratique : ¹

$$\Delta G^\ddagger = \Delta G_0^\ddagger \left(1 + \frac{\Delta G^0}{4\Delta G_0^\ddagger} \right)^2 \quad \alpha = \frac{\partial \Delta G^\ddagger}{\partial \Delta G^0} = \frac{1}{2} \left(1 + \frac{\Delta G^0}{4\Delta G_0^\ddagger} \right)$$

La barrière intrinsèque vaut $\Delta G_0^\ddagger = (D_{RX} + \lambda_0)/4$, où D_{RX} est l'énergie de la liaison R-X et λ_0 l'énergie de réorganisation du solvant autour de la molécule. Cela implique que la force motrice mise en jeu $\Delta G^0 = E - E_{RX/R^{\bullet}+X^-}^0$ est importante ($\Delta G^0 \ll 0$). Le potentiel de pic est donc plus négatif que le potentiel standard $E_{RX/R^{\bullet}+X^-}^0$, comme l'illustre la figure 46. Une conséquence en est que le coefficient de transfert α est plus petit que 0,5, ce qui se traduit sur les voltamogrammes par une vague très large dès les faibles vitesses de balayage, avec une largeur à mi-hauteur généralement supérieure à 100 mV. Dans un processus séquentiel en deux étapes, le coefficient de transfert α est au contraire le plus souvent assez proche de 0,5 (ΔG^0 proche de 0) car la barrière intrinsèque est beaucoup plus faible (essentiellement due à la réorganisation du solvant).

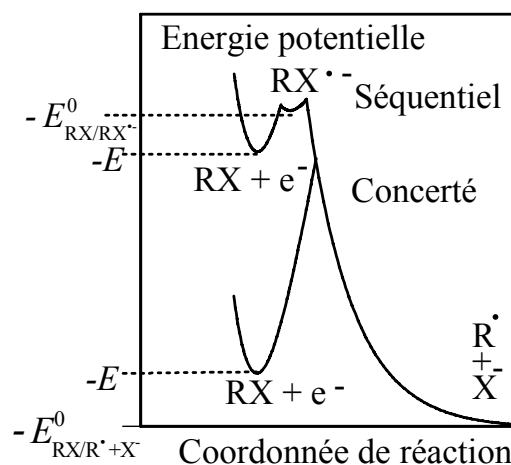
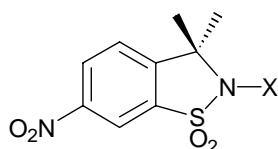


Figure 46. Diagramme d'énergie potentielle de la coupure réductrice de RX. Voies séquentielle et concertée.

Une ambiguïté peut toutefois persister entre mécanisme concerté et mécanisme séquentiel doté d'une grande barrière intrinsèque. Dans ce cas, il faut raisonner par rapport au comportement de composés ayant une structure similaire au substrat étudié, de manière à estimer aussi précisément que possible $E_{RX/RX^{\bullet}}^0$, et ensuite confronter cette valeur aux résultats expérimentaux obtenus. Par exemple, si on peut montrer que $E_{RX/RX^{\bullet}}^0$ est plus négatif que le potentiel de pic mesuré, et si le coefficient de transfert mesuré est inférieur à 0,5, alors la conclusion est que le mécanisme suivi est concerté.

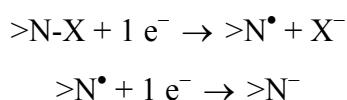
Par exemple, un processus concerté est suivi lors de la coupure réductrice de la liaison azote-halogène dans des N-halogéno sultams nitrés, bromé et chloré (schéma 31).² Les voltamogrammes de ces deux composés présentent deux vagues.



X = Cl, Br

Schéma 31. *N*-halogéno sultams nitrés, chloré et bromé.

La première vague, irréversible et large (174 et 114 mV à 0,1 V s⁻¹, pour les dérivés chloré et bromé respectivement) correspond à la réaction de coupure de la liaison azote-halogène, avec expulsion de l'halogénure. La stœchiométrie électronique de la vague montre que la réduction implique l'échange de 2 électrons. La coupure est en effet suivie de la réduction du radical formé :



La largeur de la vague et son déplacement avec la vitesse de balayage conduisent à des valeurs de α de l'ordre de 0,3 et 0,4 pour les composés chloré et bromé respectivement. De telles valeurs du coefficient de transfert indiquent que le potentiel de pic est plus négatif que le potentiel standard de la réaction ($\Delta G^0 = E_p - E^0 \ll 0$). Or le potentiel standard de formation du radical anion $E_{>\text{N-X}/>\text{N-X}^\bullet}^0$ pour les deux sultams se situe autour de - 0,95 V vs. ECS, soit à un potentiel beaucoup plus négatif que les potentiels de pic mesurés (- 0,14 et 0,35 V à 0,1 V s⁻¹ pour les sultams chloré et bromé respectivement). Le processus de coupure réductrice de la liaison azote halogène dans les sultams nitrés chloré et bromé est donc bien concerté.

¹ (a) Savéant, J.-M. (1987) A simple model for the kinetics of dissociative electron transfer in polar solvents. Application to the homogeneous and heterogeneous reduction of alkyl halides, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 6788-6795. (b) Savéant, J.-M. (1992) Dissociative electron transfer. New tests of the theory in the electrochemical and homogeneous reduction of alkyl halides, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10595-10602.

² Andrieux, C. P., Differding, E., Robert, M. et Savéant, J.-M. (1993) Controlling factors of stepwise versus concerted reductive cleavages. Illustrative examples in the electrochemical reductive breaking of nitrogen-halogen bonds in aromatic *N*-halosultams, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6592-6599.

Annexe 4

Modélisations quantiques

Calculs quantiques

La base utilisée dans tous les calculs est la base classique 6-31G*. Les orbitales moléculaires sont développées sur la base d'orbitales atomiques elles-mêmes combinaisons linéaires de fonctions gaussiennes. La base 6-31G* signifie que les orbitales atomiques de cœur sont des combinaisons linéaires de six gaussiennes et les orbitales atomiques de valence sont représentées par deux fonctions (diffuse et contractée) dont l'une est une combinaison linéaire de deux gaussiennes et l'autre est une gaussienne unique. Des fonctions de polarisation sont ajoutées aux atomes autres que les atomes d'hydrogène pour rendre compte du fait que les charges ne sont pas nécessairement localisées sur les centres atomiques.

Les charges atomiques et les densités de spin sont obtenues par une analyse de population selon la méthode de Mulliken.

Les géométries des extrema sont optimisées en phase gazeuse au niveau de calcul B3LYP/6-31G*. Les enthalpies libres en phase gazeuse sont alors obtenues après un calcul de fréquence à ce même niveau de calcul par la relation :

$$G_{B3LYP} = E_{B3LYP}^{elec} + ZPE + E^{therm} - TS \quad (A2)$$

(E : énergies, $elec$: électronique, $therm$: thermique, T : température, S : entropie). L'énergie thermique inclut des termes de rotation, de translation, de vibration ainsi que le terme PV assimilé à nRT en phase gazeuse permettant de passer de l'énergie à l'enthalpie.

Solvatation

Les systèmes étudiés étant chargés, la solvation a un effet important. Celle-ci sera prise en compte partiellement dans la mesure où les méthodes actuellement disponibles ne permettent pas de faire des optimisations de géométrie dans le solvant avec des temps de calcul raisonnables même pour des systèmes relativement petits comme ceux étudiés ici. Les enthalpies libres de solvation, G^{solv} , seront donc obtenues sur les géométries optimisées en phase gazeuse. On utilise une méthode de solvation par des continums diélectriques, le

modèle COSMO (COnductor Solvent Model). Dans ce modèle, le soluté est enfermé dans une cavité définie par des sphères centrées sur les différents atomes. Cette surface est lissée par l'ajout d'autres sphères pour simuler la surface d'exclusion du solvant. Les enthalpies libres en solution sont obtenues par la relation :

$$G^S = G^{gp} + G^{solv} + nRT(\ln(22,4) - 1) \quad (A3)$$

Le terme $nRT\ln(22,4)$ provient du fait qu'en solution, dans les conditions standard, le volume molaire est de 1 L alors qu'il est de 22,4 L en phase gazeuse. Le terme $-nRT$ provient du fait qu'en solution le terme PV permettant de passer de l'énergie à l'enthalpie est négligeable alors qu'il vaut nRT en phase gazeuse.

Chemins réactionnels

La nature des clusters de réactifs (RC) et de produits (PC) reliés à chacun des états de transition trouvés en phase gazeuse est déterminée par le calcul d'un chemin réactionnel. Il y a plusieurs choix possibles pour définir un chemin réactionnel. La méthode proposée par Fukui, appelée IRC ("intrinsic reaction coordinate") est celle utilisée ici. Elle correspond au chemin de plus forte pente issu de l'état de transition si les coordonnées utilisées (cartésiennes ou internes) sont pondérées par les masses. Ainsi défini, il est également possible de montrer que l'IRC possède une signification dynamique. C'est le chemin suivi à partir de l'état de transition par une particule classique glissant avec une vitesse infinitésimale sur la surface de potentiel. Sa direction initiale au niveau de l'état de transition est donnée par le mode normal de la fréquence imaginaire. Les chemins réactionnels sont donc déterminés en phase gazeuse au niveau de calcul B3LYP/6-31G* en utilisant les coordonnées internes pondérées par les masses. Le pas utilisé est de 0,1 en unités atomiques, soit $\text{amu}^{1/2} \cdot \text{bohr}$.